

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
21. Dezember 2000 (21.12.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 00/77511 A1

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: G01N 27/447,  
B01L 3/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/05518

(22) Internationales Anmeldedatum:  
15. Juni 2000 (15.06.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
199 27 533.5 16. Juni 1999 (16.06.1999) DE  
199 27 534.3 16. Juni 1999 (16.06.1999) DE  
199 27 535.1 16. Juni 1999 (16.06.1999) DE  
PCT/EP00/05204 6. Juni 2000 (06.06.2000) EP  
PCT/EP00/05205 6. Juni 2000 (06.06.2000) EP  
PCT/EP00/05206 6. Juni 2000 (06.06.2000) EP

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): MERCK PATENT GMBH [DE/DE]; Frankfurter Strasse 250, D-64293 Darmstadt (DE). GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER SPEKTROCHEMIE UND ANGEWANDTEN SPEKTROSKOPIE E.V. [DE/DE]; Bunsen-Kirchhoff-Strasse 11, D-44139 Dortmund (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): EISENBEISS, Friedhelm [DE/DE]; Luisenstr. 28, D-64331 Weiterstadt (DE). STANISLAWSKI, Bernd [DE/DE]; Ilkenhansstr. 13, D-60433 Frankfurt (DE). GREVE, Thomas [DE/DE]; Dieburger Str. 238, D-64287 Darmstadt (DE). BENDER, Renate [DE/DE]; Altheimweg 14, D-64291 Darmstadt (DE). HERGENRÖDER, Roland [DE/DE]; Immermannstr. 35, D-44147 Dortmund (DE). WEBER, Günther [DE/DE]; Justusweg 2, D-44149 Dortmund (DE).

GRASS, Benedikt [DE/DE]; Schlesien Str. 30, D-59457 Werl (DE). NEYER, Andreas [DE/DE]; Langerfelderstr. 69a, D-56838 Iserlohn (DE). JÖHNCK, Matthias [DE/DE]; Dülmener Str. 27a, D-48163 Münster (DE). SIEPE, Dirk [DE/DE]; Vinckeplatz 7, D-44139 Dortmund (DE). KANIANSKY, Dusan [SK/SK]; Sevcenkova 28, 851 01 Bratislava (SK).

(74) Gemeinsamer Vertreter: MERCK PATENT GMBH; D-64271 Darmstadt (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- Mit internationalem Recherchenbericht.
- Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: DEVICE FOR PREPARING SAMPLES

(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG ZUR PROBENVORBEREITUNG

(57) Abstract: The invention relates to an analysis unit for the preparation of samples, comprising at least one through-flow unit which is made of plastic and provided with a micro-structured channel system, an adapter chamber which reversibly accommodates the through-flow unit and at least one detector. The invention is characterized in that at least one channel section is provided with fluidic connections on the respective ends thereof and is used to charge sample volumes ranging between 0.1 and 20 µl with a deviation of less than 5 %, for the most part 1-5 %.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine Analyseeinheit zur Probenvorbereitung, zumindest umfassend eine Durchflusseinheit aus Kunststoff mit einem mikrostrukturierten Kanalsystem, eine Adapterkammer zur reversiblen Aufnahme der Durchflusseinheit, eine Fluidikversorgung, eine Spannungsversorgung und mindestens einen Detektor, dadurch gekennzeichnet, dass mittels mindestens eines Kanalabschnitts, an dessen Enden jeweils Fluidikanschlüsse vorhanden sind, Probenvolumina zwischen 0,1 und 20 µl mit einer Abweichung von unter 5 %, zumeist zwischen 1 bis 5 %, aufgegeben werden können.

WO 00/77511 A1

### Vorrichtung zur Probenvorbereitung

Die Erfindung betrifft eine miniaturisierte Vorrichtung zur Vorbereitung von Probenmaterial mit Analyten in überwiegend wässriger Lösung.

5

Insbesondere bei der Analyse und Extraktion von komplexen Materialien wie z.B. Zellen, Blut oder Nahrungsmitteln müssen vor der eigentlichen Analyse oder Isolierung bestimmter Komponenten aufwendige Reinigungsschritte durchgeführt werden, um die Analyten von der komplexen und oft störenden Matrix zu befreien. Erst durch diese Vorreinigung wird die weitere Analyse oder Aufreinigung möglich.

10

15

Bekannte Methoden zur Probenvorbereitung sind beispielsweise Fällungen oder Extraktionen. Doch auch nach derartigen Vorbehandlungen bleiben viele Proben noch zu komplex. Eine weitere Möglichkeit zur Probenvorbereitung stellen chromatographische oder elektrophoretische Methoden dar. Um mit diesen Verfahren jedoch ausreichend gereinigte Proben zu erhalten, ist oftmals ein hoher apparativer Aufwand nötig.

20

Für analytische Anwendungen wurden in der letzten Zeit miniaturisierte mikrostrukturierte Analysensysteme mit planaren Kanalsystemen (Mikrochips) entwickelt. Miniaturisierte Analysensysteme bieten den Vorteil, zumeist elektrophoretische Trennungen ohne großen Aufwand und Verbrauch an Reagenzien durchzuführen. Ein Beispiel hierfür ist der Bioanalytiker von Agilent Technologies, Deutschland.

25

30

Diese Systeme sind jedoch ausschließlich für analytische Zwecke konzipiert. Voraussetzung für eine effektive und empfindliche Analyse ist jedoch oftmals eine effektive Probenvorbereitung, die diese Systeme nicht leisten können. Nur ein sehr geringer Teil des Probenvolumens gelangt letztendlich in den Trennkanal. Dadurch ist es schwierig, ein Volumenelement einzubringen, das eine statistisch repräsentative

Zusammensetzung der ursprünglichen Probe besitzt. Nach erfolgter Analyse wird der Mikrochip verworfen. Die Analyten verbleiben auf dem Mikrochip.

5 Demnach sind derartige Analysensysteme nicht zur Probenvorbereitung geeignet. Es ergibt sich daher die Aufgabe, das vorteilhafte Konzept der miniaturisierten Analysensysteme zu nutzen und Systeme zu entwickeln, die insbesondere für die Probenvorbereitung geeignet sind. Dazu müssen die Analyseeinheiten folgende Anforderungen erfüllen:

- 10 - im Gegensatz zu rein analytischen Systemen ist es bei Analyseeinheiten zur Probenvorbereitung wichtig, daß große Probenvolumina verarbeitet werden können.
- Falls die Analyten nach der Aufreinigung z.B. weiteren Analysen (z.B. Massenspektrometrie) oder Derivatisierungen zugeführt werden sollen,
- 15 müssen sie aus Analyseeinheit zur Probenvorbereitung entnommen werden können.
- Sehr geringe Mengen an Analyt müssen aus einer großen Menge an Probenmatrix isoliert werden können.
- Nach der Aufreinigung sollte der Analyt in möglichst konzentrierter Form
- 20 vorliegen.

Es wurde gefunden, daß die oben genannten Anforderungen zur Probenvorbereitung von einer miniaturisierten Analyseeinheit, bestehend aus einem mikrostrukturierten planaren Kanalsystem aus Kunststoff als Durchflußeinheit, einer Adapterkammer zur reversiblen Aufnahme der

25 Durchflußeinheit, einer Fluidikversorgung, einer Spannungsversorgung und Detektoren, erfüllt werden. Die erfindungsgemäße Analyseeinheit besitzt insbesondere eine Vorrichtung zur präzisen Aufnahme von großen Probenvolumina über 0,1 µl und bevorzugt eine Vorrichtung zum Ausschleusen von Probenanteilen. Die Auftrennung erfolgt bevorzugt

30 isotachophoretisch.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher eine Analyseeinheit zur Probenvorbereitung, zumindest umfassend eine Durchflußeinheit aus Kunststoff mit einem mikrostrukturierten Kanalsystem, eine Adapterkammer zur reversiblen Aufnahme der Durchflußeinheit, eine Fluidikversorgung, eine Spannungsversorgung und mindestens einen Detektor, dadurch gekennzeichnet, daß zur Aufnahme der Probe ein Kanalabschnitt vorgesehen ist, an dessen Enden sich jeweils Fluidikanschlüsse befinden.

In einer bevorzugten Ausführungsform besitzt die erfindungsgemäße Analyseeinheit eine Vorrichtung zum Ausschleusen von Probenteilen, die im wesentlichen aus einem Kanalsystem mit mindestens einer Y-Verzweigung, mindestens drei Transportelektroden und mindestens einer Detektionsvorrichtung vor besagter Verzweigungsstelle des Kanalsystems und einer elektrischen Schaltvorrichtung besteht.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden als Fluidikanschlüsse Peristaltikpumpen, Spritzen oder Spritzenpumpen verwendet.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Verwendung der erfindungsgemäßen Analyseeinheit zur isotachophoretischen Auftrennung einer Probe.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist zudem die Verwendung der erfindungsgemäßen Analyseeinheit zur Abreicherung von Matrixkomponenten aus einer Primärprobe, zur Extraktion von Analyten aus einer Primärprobe, zur Abtrennung von Analyten aus der Primärprobe oder zur Anreicherung von Analyten im Unterschuß.

Abbildung 1 zeigt eine mögliche Anordnung des Kanalsystems für die erfindungsgemäße Vorrichtung zur Probenaufgabe

Abbildung 2 zeigt eine mögliche Vorgehensweise bei der Befüllung einer miniaturisierten Analyseeinheit.

5      Abbildung 3 zeigt schematisch das Kanalsystem einer Durchflußeinheit mit einer erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Probenaufgabe und verschiedenen Möglichkeiten zur Probenentnahme.

10      Abbildung 4 veranschaulicht das Ausschleusen einer Substanz mithilfe der erfindungsgemäßen Ausschleusevorrichtung.

Abbildung 5 zeigt eine geeignete Vorrichtung zum Ein- und/oder Auskoppeln optischer Leistung in definierte Bereiche mikrostrukturierter planarer fluidischer Systeme

15      Abbildung 6 zeigt schematisch die Anbindung von Fluidik und Elektrik an eine Durchflußeinheit.

20      Die Erläuterungen zu den Abbildungen 7 bis 10 finden sich in den Beispielen 3 und 4.

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Analyseeinheit, mit der über 0,1 µl flüssiges Probenmaterial quantitativ entnommen, mittels elektrophoretischer Prozesse kontrolliert aufgereinigt und optional analysiert oder weiteren Systemen zugeführt werden kann. Die  
25      Gesamtkonzentration an gelösten, ionischen Komponenten kann dabei in einem Bereich von 1 µM bis 10 mM liegen.

Die erfindungsgemäße Analyseeinheit zur Probenvorbereitung besteht zumindest aus den folgenden Bestandteilen:

- 30      - einer Durchflußeinheit aus Kunststoff mit einem mikrostrukturierten Kanalsystem

- einer Adapterkammer zur reversiblen Aufnahme der Durchflußeinheit
- einer Fluidikversorgung
- einer Spannungsversorgung
- mindestens einem Detektor

5 Die Durchflußeinheit ist weiterhin so strukturiert, daß eine Vorrichtung zur Aufgabe von Probenvolumina zwischen 0,1 und systembedingt typischerweise 20 µl mit einer Abweichung von unter 5% vorhanden ist. Falls die übrigen Geräteparameter der Analyseeinheit, wie z.B. die Stromversorgung, die für eine effektive Trennung und Analyse wichtig sind,  
10 angepasst werden, können auch größere Probenvolumina aufgegeben werden. Das Probenvolumen wird lediglich durch das Volumen des Kanalabschnittes definiert, der von den Fluidikanschlüssen begrenzt wird. Bevorzugt ist zudem eine Vorrichtung zum Ausschleusen von Probenteilen integriert.

15 Im folgenden wird der Aufbau der einzelnen Teile der erfindungsgemäßen Analyseeinheit beschrieben:

**Durchflußeinheit:**

20 Das Kernstück mikrofluider bzw. mikrostrukturierter Systeme sind in der Regel eine Durchflußeinheit, die zumindest das Kanalsystem sowie optional Aussparungen zur Integration peripherer Einrichtungen aufweist, und peripheren Einrichtungen, wie Detektoren, Fluidikanschlüsse, Vorratsgefäße, Reaktionskammern, Pumpen, Steuervorrichtungen etc., die  
25 in die Durchflußeinheit integriert bzw. daran angeschlossen werden können. Als Durchflußeinheiten für eine Analyseeinheit sind erfindungsgemäß Systeme geeignet, in denen durch Zusammenfügen von mindestens zwei Bauteilen, wie z.B. Substrat und Deckel, Mikrokanalstrukturen erzeugt werden, die flüssigkeits- und/oder gasdicht verschlossen  
30 werden können.

Das Kanalsystem der Durchflußeinheit weist typischerweise zwei oder mehrere Kanalsegmente für die Aufnahme von Trennpuffern auf. Diese Kanalsegmente sind jeweils mit Fluidikanschlüssen zum Ein- und Ausbringen der Puffer versehen. Falls die Kanalsegmente zusätzlich als  
5 Trennkanal dienen, können die Fluidikanschlüsse auch zur Entnahme von Analyten oder Matrixkomponenten genutzt werden.

Weiterhin enthält das Kanalsystem mindestens ein Kanalsegment für die Aufnahme der Probe mit Fluidikanschlüssen zum Einbringen der Probe  
10 bzw. zum Ausbringen der aufgereinigten Probe oder der Matrix.

Bevorzugt werden mit der erfindungsgemäßen Analyseeinheit die Proben isotachophoretisch aufgetrennt, da damit die Möglichkeit gegeben ist, kleinste Mengen von Analyten aus großen Probenvolumina anzureichern und zu separieren. Dafür muß die Durchflußeinheit es gestatten, das  
15 Probenvolumen zu Beginn der isotachoporetischen Trennung direkt zwischen zwei Zonen von wässrigen Puffern einzubringen, wobei ein Puffer, der sogenannte Leitpuffer, Ionen von höherer elektrophoretischer Mobilität aufweist als die zu analysierenden Komponenten der Probe und  
20 der andere Puffer, der Schlußpuffer, Ionen von geringerer elektrophoretischer Mobilität.

Die Bauteile der Durchflußeinheit der Analyseeinheit bestehen bevorzugt aus kommerziell erhältlichen thermoplastischen Kunststoffen, wie PMMA  
25 (Polymethylmethacrylat), PC (Polycarbonat), Polystyrol oder PMP (Polymethylpenten), cycloolefinischen Copolymeren oder duroplastischen Kunststoffen, wie beispielsweise Epoxidharzen. Bevorzugterweise bestehen alle Bauteile eines Systems aus demselben Material.

30 Die Bauteile können nach dem Fachmann bekannten Methoden hergestellt werden. Bauteile, die Mikrostrukturen enthalten, können beispielsweise durch etablierte Verfahren, wie Heißprägen, Spritzguß oder Reaktionsguß,

produziert werden. Besonders bevorzugt werden Bauteile eingesetzt, die nach bekannten Techniken zur Massenproduktion vervielfältigt werden können. Mikrostrukturierte Bauteile können Kanalstrukturen mit Querschnittsflächen zwischen 10 und 250000  $\mu\text{m}^2$  besitzen.

5

Zur Integration von Elektroden in die Durchflußeinheit werden die Elektroden bevorzugt an einem Bauteil des Systems, dem Deckel angebracht. Sie müssen dazu eine hinreichende Haftfestigkeit auf dem Kunststoffbauteil aufweisen. Dies ist sowohl für das Zusammenfügen der einzelnen Bauteile als auch für den späteren Einsatz der gesamten Vorrichtung von Bedeutung. Werden bei der Verbindung der Bauteile z.B. Klebstoffe eingesetzt, darf der Klebstoff die Elektrode nicht von der Kunststoffoberfläche ablösen. Weiterhin sollten die Elektroden aus chemisch inerten Materialien, wie z.B. Edelmetallen (Platin, Gold) bestehen.

10

15

Die Metallisierung von Kunststoffoberflächen erfolgt typischerweise durch elektrochemisches Abscheiden von Metallen aus Metallsalzlösungen. Hierfür ist es allgemein üblich, in einem mehrstufigen Prozeß zunächst die Kunststoffoberfläche chemisch oder mechanisch vorzubehandeln, einen diskontinuierlichen Primer aufzubringen und abschließend die elektrochemische Abscheidung durchzuführen. Beschreibungen dieser Metallisierungstechniken finden sich z.B. in US 4,590,115, EP 0 414 097, EP 0 417 037 und bei Wolf und Gieseke (G.D. Wolf, H. Gieseke, „Neues Verfahren zur ganzflächigen und partiellen Metallisierung von Kunststoffen,“ Galvanotechnik 84, 2218-2226, 1993). Den naßchemischen Verfahren gemeinsam ist, daß relativ aufwendige Vorbehandlungsprozesse notwendig sind, um ausreichende Haftfestigkeiten zu erreichen.

20

25

30

In DE 196 02 659 wird das haftfeste Aufbringen von Kupfer auf mehrphasige Polymermischungen mittels Aufdampfen oder Sputtern beschrieben. Als Ursache der guten Haftung wird die Zusammensetzung

der Polymermischungen genannt. Demnach müssen die Mischungen Polyarylsulfide, Polyimide oder einen aromatischen Polyester enthalten.

- 5 Der Einfluß von Plasmavorbearbeitungen zur Erzielung besserer Hafteigenschaften von Metallen auf Kunststoffoberflächen wird von Friedrich (J. Friedrich, „Plasmabehandlung von Polymeren“, kleben & dichten 41, 28-33, 1997) am Beispiel verschiedener kommerziell erhältlicher Thermoplaste zusammengefaßt.
- 10 Besonders bevorzugt werden die Elektrodenstrukturen auf den Kunststoffbauteilen mittels einer Zwei-Schicht-Technik erzeugt. Dazu wird zunächst eine haftvermittelnde Schicht aus Chromoxid erzeugt. Im Gegensatz zu Edelmetallen zeigt Chromoxid hervorragende Hafteigenschaften auf Kunststoffoberflächen. Zudem ist Chromoxid im Gegensatz zu
- 15 elementarem Chrom und anderen Übergangsmetallen wesentlich beständiger gegenüber Redoxprozessen. Auf die Haftschrift aus Chromoxid wird dann das Edelmetall, wie beispielsweise Platin oder Gold oder Legierungen dieser Metalle, aufgetragen.
- 20 Das selektive Aufbringen von Chromoxid und der darauf abzuscheidenden Edelmetallschicht auf Kunststoffsubstraten erfolgt bevorzugt im lift-off-Verfahren oder mittels der Schattenmaskentechnik oder der Strukturierung von zunächst ganzflächig aufgetragenen metallischen Schichten. Diese Verfahrenstechniken sind Standardprozesse der Mikrostrukturtechnik. Im
- 25 folgenden werden die für die Zwei-Schicht-Technik erforderlichen Arbeitsschritte für die genannten Verfahren kurz beschrieben.
- 30 Lift-off-Verfahren: Das selektiv zu metallisierende Kunststoffbauteil wird mit einem Photolack beschichtet. Dieser Photolack darf dabei das zu metallisierende Kunststoffteil nicht bzw. nur leicht anlösen. Für PMMA hat sich z.B. ein Photolack der Firma Allresist, Berlin (AR 5300/8) als geeignet erwiesen. Nach Belichtung und Entwicklung der zu metallisierenden

Strukturen erfolgt das Aufbringen der metallischen Schichten in einer Sputteranlage. Das Aufbringen der Chromoxidschicht erfolgt während des Sputterprozesses durch das Einleiten von Sauerstoff in das typischerweise verwendete Argon-Plasma der Sputteranlage. Als Sputtertarget wird ein konventionelles Chrom-Target verwendet. Typische Chromoxid-Schichtdicken sind 10-50 nm. Alternativ kann direkt ein Chromoxid-Target eingesetzt werden. Das Sputtern von Platin bzw. dessen Legierungen oder von Gold wird direkt anschließend unter Standardbedingungen, d.h. im Argon-Plasma, durchgeführt. Als vorteilhaft für die Haftfestigkeit der Chromoxidschicht hat sich außerdem ein vor dem Sputtern des Chromoxids durchgeführtes Rücksputtern des Kunststoffes in einem Sauerstoff/Argon (ca. 5 Vol% / 95 Vol%) Plasma erwiesen. In dem eigentlichen lift-off-Prozeß wird der noch vorhandene Photolack und mit diesem die auf dem Lack befindliche Metallschicht in einem Entwickler der Firma Allresist (AR 300-26) von dem Kunststoffbauteil abgelöst.

Schattenmaskentechnik: Das selektiv zu metallisierende Kunststoffteil wird mit einer sogenannten Schattenmaske abgedeckt. Diese hat an den zu metallisierenden Bereichen Aussparungen. Durch diese hindurch werden die Metallschichten in Analogie zum lift-off-Verfahren aufgesputtert.

Strukturierung flächiger metallischer Schichten: Auf einem selektiv zu metallisierenden Kunststoffteil wird zunächst ganzflächig eine Metallschicht in Analogie zum bereits beschriebenen Sputterprozeß aufgebracht. Diese wird in nachfolgenden Prozeßschritten, entweder durch selektiven Abtrag mittels z.B. Laserablation (Gold und Platin) oder z.B. durch selektives naßchemisches Ätzen, strukturiert. Zur Strukturierung mittels naßchemischem Ätzen wird auf die Metallschicht zunächst ein Photolack (Hoechst AG, Deutschland; AZ 5214) aufgebracht, belichtet und entwickelt. Gold wird dann in Cyanid-Lösung in den belichteten Bereichen abgelöst. Die elektrisch nicht leitende Chromoxid-Schicht bleibt zurück. Abschließend

wird der verbliebene Photolack mit einem Entwickler (z.B. AR 300-26, Fa. Allresist, Berlin) abgelöst.

5 Die Haftfestigkeit von mit Chrom als auch mit Chromoxid als Haftschrift  
mittels Sputtertechnik hergestellten Elektroden wurde mit Hilfe von  
Abreißtests überprüft. Die Haftfestigkeit der Chromoxidschichten ist deutlich  
größer. Auch bei Ultraschallbehandlung in alkalischer Lösung sind die  
Metallschichten, welche mit Chromoxid als Haftschrift hergestellt wurden,  
10 verglichen mit Metallschichten, die mit Chrom als Haftschrift hergestellt  
wurden, deutlich beständiger.

Nach Produktion und Vorbereitung der einzelnen Bauteile werden diese  
zusammengefügt. Bevorzugterweise ist ein Bauteil, das Substrat,  
mikrostrukturiert und mit rückseitigen Bohrungen bzw. Aussparungen zum  
15 Befüllen der Kanäle und/oder Kontaktieren der Elektroden versehen.  
Desweiteren hat sich auch die Verwendung einer sogenannten Dichtlippe,  
d.h. einer die Kanalstrukturen vollständig umschließenden Erhebung auf  
den Substraten mit Höhen zwischen typischerweise 0,5 bis 5 µm,  
hinsichtlich des Verklebeprozesses als sehr vorteilhaft erwiesen. Das  
20 andere Bauteil, der Deckel, dient zur Abdeckung und ist z.B. bei elektro-  
phoretischen Analyseeinheiten mit den Elektroden versehen. In diesem Fall  
wird der Deckel erfindungsgemäß als Elektrodendeckel bezeichnet. Für  
bestimmte Anwendungen können die Durchflußeinheiten eine von dieser  
bevorzugten Anordnung abweichende Funktionalisierung der Bauteile  
25 erfordern. In diesem Fall können beispielsweise mehr als zwei Bauteile,  
z.B. zwei Deckel und ein Substrat etc, zusammengefügt werden, um  
übereinander liegende Kanalstrukturen zu erzeugen, oder weitere  
Funktionalitäten, wie Detektionssysteme, Reaktionskammern etc., in die  
Bauteile integriert werden. Erfindungsgemäß werden alle Teile der  
30 Durchflußeinheit, die mittels eines Bondingverfahrens zusammengefügt  
werden, als Bauteile bezeichnet. Sie können mikrostrukturiert sein, mit  
Elektroden versehen sein oder andere Funktionalitäten aufweisen. Eine

Unterteilung der Bauteile in Substrate und Deckel oder auch Elektroden-  
deckel, falls das entsprechende Bauteil mit Elektroden versehen ist, dient  
lediglich der näheren Beschreibung der Ausführungsform der speziellen  
Bauteile und stellt keine Einschränkung bezüglich weiterer Eigenschaften  
5 der Bauteile, wie Mikrostrukturierung etc., oder deren Kombination  
untereinander dar.

Das Zusammenfügen der Bauteile erfolgt bevorzugt mit hoher Präzision  
mittels eines Klebverfahrens. Der Klebstoff darf nicht in die Kanäle  
10 hineinlaufen und deren Oberfläche bedecken, da dies die  
Oberflächeneigenschaften der Kanäle verändern kann. Es wurde gefunden,  
daß dies beispielsweise zu verstärkter Adhäsion von Analyten, wie z.B.  
Proteinen, an den Kanalbereichen führt, die mit Klebstoff benetzt sind. Dies  
wiederum beeinflußt die Trennqualität. Genauso beeinträchtigt das  
15 Verkleben der Elektroden mit Klebstoff deren Funktionsfähigkeit.

Weiterhin ist es von großer Bedeutung, daß das Volumen der Kanäle nicht  
verändert wird, wie dies beispielsweise durch das unkontrollierte Einfließen  
von Klebstoff geschehen würde. Erfindungsgemäß wird der Kanal zur  
20 Verbesserung der Detektionsempfindlichkeit bevorzugt in der Umgebung  
der Detektionselektroden verengt. Dadurch ist es gerade in diesen  
Bereichen wichtig, daß kein Klebstoff in den Kanal gelangt.

Zum Zusammenfügen der Bauteile wird erfindungsgemäß bevorzugt  
25 zunächst auf das mikrostrukturierte Bauteil an den Stellen, an denen keine  
Strukturierung vorliegt, ein Klebstoff aufgebracht. Die Schichtdicke beträgt  
zwischen 0,5 und 10  $\mu\text{m}$ , bevorzugt zwischen 3 und 8  $\mu\text{m}$ . Typischerweise  
erfolgt die Auftragung mittels einem aus der Drucktechnik bekannten  
flächigen Walzenautrag.

30

In einer bevorzugten Ausführungsform wird hierzu über eine strukturierte  
metallische Rasterwalze, die ein definiertes Volumen an Klebstoff

aufnimmt, ein dünner Klebstofffilm auf eine zweite nicht strukturierte Walze, die mit einem Polymer beschichtet ist, aufgetragen. Von dieser wiederum erfolgt der Auftrag direkt auf das strukturierte Substrat in der Weise, daß sich bevorzugt eine Klebstoffdicke zwischen 3 und 8  $\mu\text{m}$  auf der nicht

5 strukturierten Oberfläche des Substrates ergibt. Je nach verwendetem Kunststoff (Substratmaterial) wird der Übertrag zwischen der Kunststoffwalze und dem Substrat durch eine eventuelle Viskositätssteigerung des Klebstoffes (Vorphosphorylierung) beeinflußt. Ein bedeutender Vorteil dieses Verfahrens ist, daß das Substrat relativ zu der den Klebstoff auftragenden

10 Walze nicht positioniert werden muß und trotzdem Klebstoff ausschließlich nur in den nicht strukturierten Bereichen des Substrates aufgebracht ist. Wird zuviel Klebstoff aufgetragen, wird beim Zusammenpressen von Deckel und Substrat Klebstoff in den Kanal einfließen. Ist partiell unzureichend Klebstoff aufgetragen worden, resultieren Undichtigkeiten der

15 Kanalstruktur. Dieses Verbindungsverfahren erfordert eine Ebenheit der Bauteile von bevorzugt kleiner ca. 5  $\mu\text{m}/\text{cm}$  Bauteillänge.

Der verwendete Klebstoff darf die Oberfläche der Bauteile nicht oder nur sehr schwach anlösen, damit die Elektroden beim Verklebungsprozeß nicht

20 vom Klebstoff abgelöst oder unterbrochen werden. Bevorzugterweise wird daher als Klebstoff das Produkt NOA 72, Thiolacrylat der Firma Norland, New Brunswick NJ, USA verwendet. Dieser Kleber wird photochemisch ausgehärtet. Es können jedoch für das Verfahren auch andere Arten von Klebern, wie z.B. thermisch härtende Kleber, verwendet werden, die die

25 oben genannten Voraussetzungen erfüllen.

Nach dem Aufbringen des Klebstoffs wird das zweite Bauteil mit den Dünnschichtelektroden beispielsweise auf einer Belichtungsmaschine zu dem Substrat geeignet positioniert und aufgepreßt. Hierzu wird bevorzugt

30 das Substrat mit dem aufgetragenen Klebstoff in der Belichtungsmaschine in der sonst für Silizium-Wafer vorgesehenen Position fixiert. Bevorzugt ist die Verwendung von starken Glasplatten als Preßfläche, da so direkt die

Positionierung und die photochemische Härtung des Klebers durch Bestrahlung mit einer Hg-Lampe (Emissionswellenlänge 366 nm) durchgeführt werden kann. Der Elektrodendeckel wird in der für die Belichtungsmaske vorgesehenen Position fixiert, indem er mit einer Glasplatte eingefrästen Vakuumvorrichtung gehalten wird. Da sowohl der Elektrodendeckel als auch die zur Halterung des Deckels verwendete Glasplatte transparent sind, kann durch diese Anordnung hindurch der Deckel bezüglich des Substrates justiert werden. Falls der Deckel über das Substrat hinausragt, kann dieser auch mechanisch gehalten werden.

Die Positionierung des Deckels auf dem Substrat kann für den Klebevorgang typischerweise neben einer optisch mechanischen Justage unter Zuhilfenahme von optischen Justagemarken auch passiv mechanisch mit Hilfe einer Einrastvorrichtung, optisch mechanisch ohne besondere Justagemarken oder elektrisch mechanisch mit Hilfe von elektrischen Marken (Kontakten) erfolgen.

Es wurde gefunden, daß die bevorzugten optischen metallischen Justagemarken auf dem Deckel in demselben Prozeßschritt wie die Elektroden aufgebracht, d.h. bevorzugt aufgesputtert, werden können, d.h. es ist kein Mehraufwand notwendig. Auch die entsprechenden Gegenstrukturen auf dem Substrat erfordern keine zusätzliche Prozessierung, da diese gemeinsam mit den Kanalstrukturen in einem Abformschritt in das Substrat eingebracht werden. Für die optisch mechanische Justage muß zumindest ein Bauteil aus einem transparenten Kunststoff bestehen. Mit Hilfe der erfindungsgemäß aufgebrachten Justagemarken werden die beiden Bauteile mit einer Genauigkeit von mindestens  $\pm 10 \mu\text{m}$ , typischerweise sogar  $\pm 2 \mu\text{m}$  (z.B. Soll- zu Ist-Position der Detektorelektrode) zueinander positioniert und zusammengepreßt. Die hohe Positioniergenauigkeit unterstützt die Realisierung reproduzierbarer Trenn- und Analyseergebnisse. Nun wird mit einer UV-Lampe der Klebstoff polymerisiert. Nach dem Abschalten des Vakuums für die Deckelhalterung

bzw. Lösen der mechanischen Fixierung wird die Durchflußeinheit aus der Belichtungsmaschine entnommen.

5 In einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird ein Bauteil mittels eines in der Drucktechnik bekannten Verfahren (Tampon-Druck) mit Klebstoff versehen. Das mit den Elektroden versehene Bauteil wird dazu auf den Bereichen, die beim Zusammensetzen der beiden Bauteile nicht über einem Kanal liegen oder elektrisch kontaktiert werden müssen mit dem Kleber benetzt. Mikrostrukturierte Bauteile werden so benetzt, daß  
10 kein Klebstoff in die Kanalstruktur oder sonstige Aussparungen gelangt. Bei dem Tampon-Druck handelt es sich um einen strukturierten Kleberauftrag. In einer Negativform des Substrates wird Klebstoff bevorratet. Durch ein typischerweise Silikonkissen wird dieser Klebstoff strukturiert aufgenommen und z.B. auf den Deckel so aufgebracht, daß die Bereiche,  
15 die später eine Wand eines Fluidikkanals bilden, nicht mit Klebstoff benetzt werden. Das Bauteil mit den Kanalstrukturen wird anschließend, wie bereits beschrieben, geeignet zu seinem Gegenstück positioniert und aufgepreßt. Die Aushärtung erfolgt wie oben beschrieben.

20 Auch ein strukturierter Kleberauftrag mittels Sprühtechniken (z.B. microdrop-Verfahren) oder unter Verwendung der Siebdrucktechnik ist möglich, sofern die laterale Auflösung des Kleberauftrags ausreicht.

25 Unter Aufpressen des zweiten Bauteils bzw. Zusammenpressen der Bauteile ist erfindungsgemäß zu verstehen, daß die Bauteile geeignet miteinander in Kontakt gebracht werden. Um nach der Aushärtung eine dauerhafte Verbindung der Bauteile zu erzielen, ist es zumeist nicht notwendig, eine große Kraft auszuüben, d.h. die Bauteile sehr stark aufeinander zu pressen.

30

Wird der Aushärteprozess des Klebers außerhalb der zur Positionierung von Deckel und Substrat verwendeten Justagevorrichtung durchgeführt, können

der metallisierte Deckel und das Substrat, nachdem sie zueinander justiert wurden, mittels Laserschweißen zunächst geheftet werden. Hiernach wird der Verbund aus der Justagevorrichtung genommen und in einer separaten Belichtungsappatur oder einem Ofen wird der verwendete Klebstoff  
5 ausgehärtet. Diese Vorgehensweise bedeutet eine Prozeßbeschleunigung und Vereinfachung, da das Aushärten nicht mehr in der Justagevorrichtung erfolgen muß.

Da die bevorzugterweise verwendeten thermoplastischen Materialien für  
10 Laserlicht im sichtbaren und nahinfraroten Wellenlängenbereich weitestgehend transparent sind, erfordert das Laserschweißen in diesem Wellenlängenbereich eine Absorberschicht zum Absorbieren der optischen Leistung an der Grenzfläche zwischen Deckel und Substrat. Diese Absorberschicht wird gleichzeitig mit dem Aufbringen der Leistungs- bzw.  
15 Detektorelektroden aufgebracht. Beispielsweise kann der Elektrodendeckel beim Besputtern der Elektroden mit Edelmetall zusätzlich an weiteren Stellen mit einer Edelmetallschicht als Absorberschicht besputtert werden.

Das Verschweißen eines mit 200 nm dicken Platin-Elektroden versehenen  
20 Elektrodendeckels, der somit auch zusätzliche Platin-Flächen zum Absorbieren der Laserleistung beinhaltet, mit einem Substrat (Basismaterial PMMA) erfolgt mit Diodenlaserstrahlung (Wellenlängengemisch aus 808, 940 und 980 nm) mit einer Leistung von 40 Watt bei einem Fokusdurchmesser von 1,6 mm. Die Platin-Schicht wird beim  
25 Verschweißen zerstört.

Alternativ ist auch die Verwendung eines z.B. mit Rußpartikeln gefüllten Substrates oder Deckels als Absorber möglich. Diese letztgenannte Vorgehensweise, hat aber zum Nachteil, daß dann mindestens eine  
30 Kanalwand aus einem anderen Material besteht. Auch die Möglichkeiten, optische Leistung für optische Detektionszwecke in den Kanal ein- oder auszukoppeln, werden dadurch eingeschränkt.

Die Kontaktierung der Transport- und Detektionselektroden sowie die automatische Regelung und das Umschalten des elektrischen Flusses erfolgen nach dem Fachmann bekannten Methoden.

5

Die Mikrostrukturierung der Bauteile, d.h. die Konzeption des Kanalsystems kann auf die jeweilige Anwendung angepaßt werden. Die Detektionselektroden können an jeder beliebigen Stelle im Kanalsystem positioniert werden. Besonders bevorzugt werden sie jedoch an Engstellen positioniert, an denen das Kanalsystem einen geringeren Durchmesser hat. Dadurch wird bei der Detektion eine besonders gute analytische Auflösung erzielt.

10

Bevorzugterweise besitzt eine Durchflußeinheit mehrere Segmente von Trennkanälen in Reihenanordnung oder in Verzweigung. Die Segmente besitzen einen relativ großen Querschnitt von typischerweise 0,01 bis 1,0 mm<sup>2</sup>. Zwischen den Segmenten sind Engstellen von Querschnitten < 0,01 mm<sup>2</sup>, die bei der Herstellung wahlweise mit einem Detektor versehen werden können. Auf diese Weise ist es möglich, mit einem Baumuster für die Kapillarstruktur durch Variation der Position des Detektors Durchflußeinheiten mit verschiedenen Volumenverhältnissen von Trennkanal zu Primärprobe (entspricht Kanalsegment zur Probenaufgabe) herzustellen. Die Spanne des Volumenverhältnisses Trennkanal/Primärprobe reicht typischerweise von 2/1 bis 30/1. Bei kleinen Volumenverhältnissen ist eine Trennung mit geringer Auflösung in kurzer Zeit möglich, bei großen Volumenverhältnissen kann eine Trennung mit hoher Auflösung bei längerer Trennzeit durchgeführt werden.

20

25

#### **Vorrichtung zur Probenaufgabe:**

30

Diese Vorrichtung wird durch die Konzeption des Kanalsystems der Durchflußeinheit und die Integration von Fluidikanschlüssen erzeugt.

Im Gegensatz zu anderen Aufgabemethoden wird bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung das Kanalsystem während der Probenaufgabe an zwei Stellen geöffnet. Eine Öffnung dient zur Einleitung der Flüssigkeit, d.h. beispielsweise der Probenlösung, die andere Öffnung ermöglicht den Austritt der vorher im System befindlichen Flüssigkeit oder Luft. Prinzip der erfindungsgemäßen Aufgabevorrichtung ist demnach das Verdrängen eines in einem bestimmten Kanalabschnitt befindlichen Flüssigkeits- oder Gas-Volumens durch die Probenlösung.

Durch geeignete Wahl der Eintritts- und Austrittsöffnung wird lediglich die Flüssigkeit in dem dazwischenliegenden Kanalabschnitt verdrängt bzw. der dazwischenliegende Kanalabschnitt gefüllt. Die Flüssigkeit in eventuell vorhandenen angrenzenden Seitenkanälen wird nicht ausgetauscht, da sich in den Seitenkanälen keine geöffneten Eintritts- oder Austrittsöffnungen befinden und so die Flüssigkeit in diesen Bereichen weder durch Druck noch durch Sog bewegt wird. Verluste bzw. Verdünnungen durch Flüssigkeitsströme an den Kontaktflächen zu Seitenkanälen sind im Verhältnis zum gesamten Probenvolumen, das typischerweise im  $\mu\text{l}$ -Bereich liegt, gering. Bei geeigneter konstanter Dosiergeschwindigkeit kann die Probenaufgabe sehr gut reproduzierbar erfolgen. Dies ist ein großer Vorteil gegenüber Methoden, bei denen sehr kleine Probenvolumina von wenigen Nanolitern aufgegeben werden. Eine erfindungsgemäße Aufgabevorrichtung ist prinzipiell auch für Aufgabenvolumina von weniger als 50 nl geeignet. Jedoch sind dann bezüglich Präzision und Genauigkeit Kompromisse notwendig.

Der Transport der Probenflüssigkeit kann über Fluidikanschlüsse, d.h. dicht angeschlossene Pumpen, Spritzen, Mikromischer, Elektroosmose oder hydrostatischen Druck erfolgen, bevorzugt über Pumpen- und Ventile.

Diese Vorrichtungen können bevorzugt außerhalb, möglichst dicht an der Durchflußeinheit, angebracht werden.

Die austretende Flüssigkeit muß nicht zusätzlich abgepumpt werden. Sie wird durch den Druck der injizierten Ersatzflüssigkeit hinreichend effektiv verdrängt.

5

Durch diese Art des Befüllens werden die Nachteile der elektroosmotischen Injektion vermieden, d.h. die Befüllung ist weitgehend unabhängig von Probenzusammensetzung, pH-Wert und dem Material der Durchflußeinheit. Durch die vorhandenen Ventile oder dichtschießenden Pumpen wird jede

10 störende Flüssigkeitsbewegung, wie beispielsweise durch hydrostatische Druckdifferenzen oder Elektroosmose, unterbunden.

15

Viskosität und Ionenstärke der Probenlösung oder der zu verdrängenden Lösung, d.h. z.B. eines Transportpuffers, haben nur geringen Einfluß auf die Dosierung oder die Einfüllgeschwindigkeit. Es ist möglich, Suspensionen, Emulsionen, partikel- und zellhaltige Flüssigkeiten einzufüllen. Genauso unterliegt die Wahl des Materials zum Aufbau der Analysenvorrichtung, d.h. besonders die Beschaffenheit der Wände des Kanalsystems der erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Probenaufgabe

20 keiner Einschränkung. Auch Druckschwankungen, Pulsationen, Anlauf- oder Stopeffekte während des Einbringens der Probe haben auf die Dosiergenauigkeit keinen Einfluß.

25

Die erfindungsgemäße Vorrichtung besitzt bezüglich des Aufgabevolumens systembedingt weite Grenzen. Das Volumen der Probeflüssigkeit, die injiziert werden kann, wird allein durch das Volumen des Kanalabschnitts bestimmt, der sich zwischen den Öffnungen befindet. Durch Variation der geometrischen Abmessungen dieses Abschnitts bei dem Design des Kanalsystems der Durchflußeinheit lassen sich vorab an das analytische

30 Problem angepasste Probenvolumina festlegen. Genauso ist es möglich, verschieden große Abschnitte parallel und/oder in Reihe zu implementieren, so daß das Volumen des durch die Probenlösung zu verdrängenden

Abschnitts variiert werden kann. Bevorzugterweise wird deshalb ein System zur Nutzung der erfindungsgemäßen Vorrichtung mit mehreren Kanalabschnitten unterschiedlicher Dimension versehen, die über jeweils unabhängige Fluidikanschlüsse für die Probenaufgabe verwendet werden können. Dadurch können Probenvolumina zwischen 0,1 und 20 µl in unterschiedlicher Abstufung je nach Bedarf injiziert werden. Dabei werden üblicherweise Variationskoeffizienten bei der Aufgabe von Probenvolumina ab 1 µl von etwa 5%, typischerweise unter 2% erreicht.

Auf diese Weise können quantitativ reproduzierbare und leicht handhabbare repräsentative Probenmengen eines flüssigen Analyten in ein mikrostrukturiertes System eingebracht werden.

Abbildung 1 zeigt beispielhaft eine mögliche Anordnung des Kanalsystems der erfindungsgemäßen Aufgabevorrichtung. Das Kanalsystem ist in zwei Kanalabschnitte 1A und 1B mit unterschiedlichem Volumen unterteilt. Daran angrenzend befindet sich der Trennkanal 1C. Über die Fluidikanschlüsse 11, 12 und 13 kann entweder der Kanalabschnitt 1A (Bei Öffnen der Anschlüsse 11 und 12) oder der Kanalabschnitt 1B (Bei Befüllen über die Anschlüsse 12 und 13) oder die beiden Kanalabschnitte zusammen (bei Befüllen über die Anschlüsse 11 und 13) mit der Probenlösung gefüllt werden. Nach Befüllen der Aufgabeabschnitte wird durch Anlegen einer Spannung die Probe in Abschnitt 1C aufgetrennt. Falls nur Abschnitt 1A mit der Probe befüllt wurde, kann auch Abschnitt 1B als Trennstrecke genutzt werden, so daß die Trennstrecke bei Bedarf verlängert werden kann.

Abbildung 2 zeigt eine mögliche Vorgehensweise bei der Befüllung einer miniaturisierten Analyseeinheit. Dargestellt ist ein Kanalsystem bestehend aus drei Reservoirs R1 bis R3, den Kanalabschnitten K1 bis K4, den Fluidikanschlüssen F1 bis F6 und einer Verzweigungsstelle Vz. Das in der

Abbildung gezeigte System besitzt einen Kanalabschnitt K1 zur  
Probenaufgabe. Die Trennung kann entlang des Kanalabschnitts K2 und  
K3 oder K2 und K4 erfolgen. Zur Durchführung einer isotachophoretischen  
Trennung muß das System mit einer Probe und entsprechenden Puffern  
5 befüllt werden. Dabei muß das Probenvolumen an einer Seite in Richtung  
der Trennstrecke mit einem Puffer (Leading-Puffer) und an der anderen  
Seite mit einem anderen Puffer (Terminating-Puffer) in Kontakt sein. Durch  
die Verzweigung Vz des Kanalsystems besteht die Möglichkeit, über die  
Reservoire R2 und R3 unterschiedliche Leading-Puffer einzufüllen.  
10 Das Ausschleusen von aufgetrennten Komponenten aus der Probe kann  
über den Fluidikanschluß F3 erfolgen.

Um die gewünschte Anordnung von Probe und Puffern im Kanalsystem zu  
erreichen, werden zunächst, wie unter A in der Abbildung schematisch  
15 dargestellt, die Fluidikanschlüsse F2 (Auslaß), F4, F5 und F6 (Einlässe)  
geöffnet und das Kanalsystem über die drei Reservoirs mit den beiden  
Leading-Puffern (über R2 und R3, schräg schraffiert bzw. gepunktet,  
dargestellt) und dem Terminating-Puffer (über R1, senkrecht gestreift  
dargestellt) gefüllt. Überschüssiger Puffer kann durch den Fluidikanschluß  
20 F2 austreten. Auf diese Weise füllt sich Kanalabschnitt K1 mit Terminating-  
Puffer, der Abschnitt K3 mit Leading-Puffer (LE2) über R2, Abschnitt K4 mit  
Leading-Puffer (LE1) über R3 und Kanalabschnitt K2 enthält eine Mischung  
der beiden Leading-Puffer. Die Fluidikanschlüsse F1 und F3 bleiben bei  
diesem Schritt geschlossen.

25

Der Kanalabschnitt K2 kann wahlweise mit Leading-Puffern über R2 oder  
R3 gefüllt werden. K2 stellt den ersten Abschnitt der Trennstrecke dar

In Teil B der Abbildung wird gezeigt, wie die Probe in den Kanalabschnitt  
30 K1 eingebracht wird und der Kanalabschnitt K2 mit einem Leading-Puffer  
über R3 gefüllt wird. Die Fluidikanschlüsse F5 und F6 sind geschlossen  
und es wird kein weiterer Terminating-Puffer über R1 sowie kein weiterer

Leading-Puffer (LE2) über R2 gepumpt. Fluidikanschluß F4 ist geöffnet und Kanalabschnitt K2 wird mit Leading-Puffer (LE1) über R3 gefüllt.

Gleichzeitig ist der Fluidikanschluß F1 geöffnet und die Probe wird über F1 zugeführt (dargestellt als Wellenlinien). Über den geöffneten Fluidik-  
 5 anschluß F2 kann überschüssige Probe und überschüssiger Leading-Puffer (LE1) austreten. Dadurch, daß der Leading-Puffer (LE1) und das Probevolumen simultan gegeneinander gepumpt werden, wird eine besonders präzise Füllung der Kanalabschnitte K1 und K2 erreicht. Auf diese Weise ist es möglich auch mit Pumpen, die eine geringe Pulsation  
 10 besitzen, eine exakte Befüllung vorzunehmen.

Nach Beendigung des Füllvorganges werden die Fluidikanschlüsse geschlossen. Man erhält so ein abgeschlossenes System ohne hydrodynamischen Fluß, in dem die Trennung reproduzierbar durchgeführt  
 15 werden kann. Die Probe kann ganz oder in Fraktionen über die Kanalabschnitte K2 und K3 oder über die Kanalabschnitte K2 und K4 getrennt werden. Sobald die Probe oder eine gewählte Fraktion durch den Kanalabschnitt K2 gewandert ist und an der Verzweigung Vz angekommen ist, kann entschieden werden, ob die Trennung weiter in Richtung K4 oder  
 20 K3 geführt werden soll. Dies geschieht durch dauerndes oder zeitweises Umschalten der Anodenpotentials von F4 auf F6.

Die folgende Tabelle zeigt nochmals im Überblick die Schaltung der Fluidikanschlüsse während der einzelnen Schritte der Probenaufgabe:

Füllprozeß	Fluidikanschlüsse					
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
<b>Füllprozeß A</b>	zu	offen, „Überlauf“	zu	offen (LE1 rein)	offen (TE rein)	offen (LE2 rein)
<b>Füllprozeß B</b>	offen (Probe rein)	offen, „Überlauf“	zu	offen (LE1 rein)	zu	zu

Nach Beendigung des Füllvorganges werden die Fluidikanschlüsse (F1-F6) geschlossen.

5 Im folgenden werden beispielhaft einige Schaltvorgänge für verschiedene analytische Prozesse auf einer Analyseeinheit entsprechend Abbildung 2 aufgeführt:

(Die Spannung wird jeweils hinter den Fluidikanschlüssen angelegt)

1.) Einfache Trennung (Trennkanäle K2 und K4)

10 Anode : F4 Kathode : F5

2.) 2-stufige Trennung (Ausschleusung in internen Kanal K3)

a.) Trennung in K2 Anode : F4 Kathode : F5

(Umschalten, wenn Probenkomponente kurz vor Vz)

15 b.) Trennung in K3 Anode : F6 Kathode : F5

3.) 2-stufige Trennung (Ausschleusung und Überführung in externen Kanal)

a.) Trennung in K2 Anode : F4 Kathode : F5

(Umschalten, wenn Probenkomponente kurz vor Vz)

20 b.) Überführung nach außen über F3 Anode : F3 Kathode : F5

Abbildung 3 zeigt schematisch das Kanalsystem einer Durchflußeinheit mit einer erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Probenaufgabe und verschiedenen Möglichkeiten zur Probenentnahme. Die Abschnitte bzw.  
25 Segmente des Kanalsystems sind mit K1 bis K7 bezeichnet, die Fluidikanschlüsse mit F1 bis F8 und die Detektorelektroden mit D1. Das gezeigte System bietet die Möglichkeit, Analyten aufzureinigen, indem  
1. der Analyt nicht bewegt wird und die Matrix abgetrennt wird  
2. der Analyt abgetrennt wird.

30

Im folgenden wird die Funktion der einzelnen Fluidikanschlüsse bei diesen beiden möglichen Vorgehensweisen erläutert:

- F1: Fluidikanschluß zum Befüllen von K1 (und eventuellen weiteren anschließenden Kanalsegmenten) mit Endpuffer. Bei F1 erfolgt der Anschluß an eine externe Leistungselektrode.
- 5 F2: Fluidikanschluß zum Befüllen mit Primärprobe (Einlaß)
- F3: Fluidikanschluß zum Verdrängen der aufbereiteten Probe aus K3 (Einlaß)
- F4: Fluidikanschluß zum Entnehmen der aufbereiteten Primärprobe aus K3 (Auslaß)
- 10 F5: Fluidikanschluß zum Befüllen der Durchflußeinheit mit Primärprobe (Auslaß)
- F6: Fluidikanschluß zur Entnahme der aufbereiteten Probe aus K6 (Einlaß)
- F7: Fluidikanschluß zur Entnahme der aufbereiteten Probe aus K6 (Auslaß)
- 15 F8: Fluidikanschluß zum Befüllen des Kanalsystems mit Leitpuffer. Bei F8 wird die zweite externe Leistungselektrode angeschlossen.

Somit ergibt sich für Fall 1 folgende Vorgehensweise: K1 wird mit Endpuffer, K2, K3 und K4 mit der Primärprobe und K5, K6 und K7 mit dem Leitpuffer befüllt. Während einer isotachophoretischen Auftrennung wandern nun Matrix-Bestandteile aus K2 – K4 heraus in die Kanalsegmente K5-K7. Der Analyt verbleibt in K2-K4. Demnach befindet sich am Ende der Trennung in K1 Endpuffer, in K2 bis K4 die aufbereitete Sekundärprobe mit dem Analyten und in K5 bis K7 der Leitpuffer und die abgetrennte Matrix der Primärprobe. Die Sekundärprobe mit dem Analyten kann nun aus K3 über F3 (Einlaß) und F4 (Auslaß) entnommen werden. Bevorzugt erfolgt die Entnahme unter fokussierenden Bedingungen.

Bei Fall 2, dem Abtrennen des Analyten aus der Probe wird das Kanalsystem genau wie in Fall 1 befüllt, d.h. K1 wird mit Endpuffer, K2, K3 und K4 mit der Primärprobe und K5, K6 und K7 mit dem Leitpuffer befüllt. Während der Trennung wandert der Analyt aus Kanalsegment K2-K4 in

Richtung K5-K7. Durch den Detektor D1 kann festgestellt werden, wann der Analyt die Detektionsstelle passiert und die Trennung zum gewünschten Zeitpunkt beendet werden. Idealerweise wird die Trennung beendet, wenn sich der Analyt in Kanalabschnitt K6 befindet. In K1 befindet sich dann der Endpuffer, in K2 bis K5 Endpuffer mit Matrixbestandteilen, in K6 der Analyt und in K7 der Leitpuffer und Matrixbestandteile. Der Analyt kann aus K6 über F6 (Einlaß) und F7 (Auslaß) entnommen werden. Die Entnahme erfolgt bevorzugt unter fokussierendem Feld.

#### 10 **Ausschleusevorrichtung:**

Für die erfindungsgemäße Ausschleusevorrichtung muß das Kanalsystem der Durchflußeinheit neben Bereichen zur Probenaufgabe und einem Trennkanal mindestens eine von einem Trennkanal ausgehende X- oder Y-Verzweigung aufweisen. Zur Integration mehrerer Ausschleusungsvorrichtungen können an beliebigen Stellen des Kanalsystems weitere Verzweigungen eingeführt werden.

Die Elektroden, die für die Ausschleusevorrichtung benötigt werden, sind Transporelektroden, die sich an den Enden der verzweigten Kanäle befinden und ein Umschalten des Potentials zwischen den beiden Kanälen ermöglichen, sowie Detektionselektroden, die bevorzugt zwischen 40 mm und 0,1  $\mu\text{m}$ , bevorzugt zwischen 20 mm bis 0,1 mm vor der Abzweigung positioniert sind.

Weiterhin wird zur Steuerung des Ausschleusevorgangs eine Schaltvorrichtung benötigt, mit der das Potential umgeschaltet werden kann. Das Umschalten kann manuell oder bevorzugt computergesteuert erfolgen. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform erhält die Schaltvorrichtung ein Signal, sobald der Analyt den Detektor passiert und schaltet dann selbständig zu einem geeigneten Zeitpunkt das Potential um.

Abbildung 4 veranschaulicht das Ausschleusen einer Substanz mithilfe der erfindungsgemäßen Ausschleusevorrichtung. Es werden drei verschiedene Stadien des Ausschleusens in den Bildern A, B und C gezeigt. Die schematisierte Ausschleusungsvorrichtung besteht aus einem Y-verzweigten Kanalsystem mit den Transportelektroden 1, 2 und 3 an den Enden der Kanäle. Das Kanalstück zwischen Elektrode 1 und 2 dient als Trennkanal, der zu Elektrode 3 abzweigende Kanal ist der Ausschleusungskanal. Kurz vor Abzweigung des Ausschleusungskanals befindet sich im Trennkanal eine Detektorelektrode 4. In Bild A wandern die zu trennenden Substanzen 5 und 6 aufgrund eines Potentials zwischen den Elektroden 1 und 2 entlang des Trennkanals. Bild B zeigt den Moment, in dem die gesuchte Substanz 5 die Detektorelektrode passiert. Das detektierte Signal, beispielsweise die spezifische relative Leitfähigkeit, bewirkt ein Umschalten des Potentials, so daß nun ein Potential zwischen Elektrode 1 und 3 besteht. Dadurch wandert, wie in Bild C gezeigt, Substanz 5 in den Ausschleusekanal und wird so von Substanz 6, die sich im Trennkanal befindet, separiert. Nachdem Substanz 5 den Detektorbereich passiert hat und in den Ausschleusungskanal gewandert ist, kann das Potential erneut umgeschaltet werden, damit keine weiteren Substanzen in den Ausschleusungskanal gelangen.

#### **Fluidikversorgung:**

Erfindungsgemäß werden alle Ventile, Pumpen bzw. Mikropumpen, dichtschießende Mikropumpen, Mikromischer oder sonstigen Anschlüsse der erfindungsgemäßen Vorrichtung, die zum Befüllen des Kanalsystems bzw. zum Entfernen von Gas und Flüssigkeitsresten dienen, als Fluidikanschlüsse bezeichnet. In der Regel sind die Fluidikanschlüsse erfindungsgemäß nicht in die Durchflußeinheit integriert, sondern werden zum Gebrauch von außen, d.h. von der Adapterkammer aus, an die Durchflußeinheit angeschlossen. Auf diese Weise müssen in der Durchflußeinheit lediglich entsprechende Aussparungen vorgesehen

- werden, was insbesondere für Durchflußeinheiten, die nach Gebrauch ersetzt werden, wesentlich kostengünstiger ist als der Einbau teurer Ventile etc..
- 5     An die hydrodynamische Reagenz- und Primärprobenzufuhr müssen zwei wesentliche Anforderungen gestellt werden:
1. Zu Beginn der elektrophoretischen Trennung müssen sich innerhalb des Kanalsystems der Durchflußeinheit die Zonen der Puffer und der Probenflüssigkeit reproduzierbar an den durch die Geometrie der  
10     Durchflußeinheit vorgegebenen Orten befinden.
  2. Während der gesamten elektrophoretischen Trennung sind hydrodynamische Effekte, etwa das Verschieben der Flüssigkeitssäule durch Elektroosmose, auszuschließen.
- 15     Die Erzeugung der Hydrodynamik in der erfindungsgemäßen Analyseeinheit kann mittels kommerziell erhältlicher Mikropumpen erfolgen. Es hat sich jedoch gezeigt, daß diese Mikropumpen häufig Nachteile, wie unzureichende Standzeiten, nicht reproduzierbare Flußraten oder Gasentwicklung unter Pumplast, aufweisen. Daher wird der Einsatz von  
20     Mikropumpen erfindungsgemäß nicht bevorzugt. Es wurde vielmehr gefunden, daß konventionelle Pumpen/Spritzen und Ventile für die miniaturisierte Anwendung eingesetzt werden können. Voraussetzung dafür ist die zeitliche Synchronisierung der hydrodynamischen Prozesse.
- 25     Für Punkt 1 ist es erforderlich, etwa vorhandene Gasblasen aus dem Kanalsystem zu entfernen. Dies ist mit einem aktiven hydrodynamischen System, wie etwa einer peristaltischen Pumpe leicht möglich, indem ein Gasbolus zum Einsammeln von kleineren Gasblasen benutzt wird. Aufgrund der durch die Geometrie der Durchflußeinheit fest vorgegebenen  
30     Volumina und der im Bereich der miniaturisierten Dimensionen zu vernachlässigenden Mischeffekte, ist es nicht notwendig eine präzise Volumendosierung vorzunehmen. Die mit dem Betrieb von

Peristaltikpumpen einhergehende Pulsation der Flüssigkeitsäule erwies sich als unschädlich, sobald zwei Pumpen synchronisiert im Gegenstrom zueinander eingesetzt wurden. Ebenso ist das Meßprinzip weitgehend unempfindlich gegenüber Schwankungen in den Flußraten. Dies ermöglicht die Verwendung von robusten und preiswerten Vorrichtungen, wie z.B. Peristaltikpumpen, Spritzen oder Spritzenpumpen. Der Einsatz von teuren und störanfälligen sogenannten Mikropumpen ist nicht erforderlich.

Für Punkt 2 ist es erforderlich, daß das Kanalsystem der Durchflußeinheit während der Elektrophorese hydrodynamisch geschlossen ist. Dies wird entweder durch Pumpen mit inhärenter Ventilfunktion oder durch die Kombination von Pumpen mit zusätzlichen Ventilen erreicht. Das Totvolumen der verwendeten Ventile erwies sich überraschenderweise als unschädlich sobald der Schließvorgang der Ventile zeitlich synchron durchgeführt wurde.

Bei dieser optimierten Steuerung der hydrodynamischen Funktionen konnten typische Volumenabweichungen von unter 2 % erreicht werden.

## **Spannungsversorgung:**

Die Spannungsversorgung dient der Durchführung der elektrophoretischen Trennung. Sie erfolgt durch Anschluß von Leistungselektroden an die Durchflußeinheit oder bevorzugt durch Kontaktierung von in der Durchflußeinheit integrierten Leistungselektroden über entsprechende Anschlüsse. Bevorzugt liefert die Vorrichtung zur Spannungsversorgung Stromstärken zwischen 0 und 50  $\mu\text{A}$  bei einer maximalen Spannung von 8 KV. Die Schwankung der Spannung sollte nicht über  $\pm 2\%$  liegen.

30

**Detektoren:**

Die Detektion der Analyte erfolgt bevorzugt optisch oder elektrochemisch. Im allgemeinen sind die Detektoren der erfindungsgemäßen Analyseeinheit  
5 derart gestaltet, daß sich auf der Durchflußeinheit entsprechende Kontaktstellen befinden, die dann von außen, d.h. in der Regel von der Adapterkammer aus, angeschlossen werden können. Im Falle einer elektrischen Detektion befinden sich demnach in der Durchflußeinheit  
10 entweder integrierte Elektroden, die von außen kontaktiert werden können, oder Aussparungen, in die reversibel Elektroden von außen eingebracht werden können. Entsprechendes gilt für optische Detektoren.

Bei Leitfähigkeitsmessungen müssen die Detektorelektroden und der Leitfähigkeitsdetektor entkoppelt sein. Dies erfolgt bevorzugt über PTFE  
15 (Polytetrafluorethylen) isolierte Spulen.

Für Analyseeinheiten, in denen Substanzen elektrophoretisch aufgetrennt werden, wird die Forderung einer universellen Detektionsmethode  
20 besonders gut von elektrischen Detektionsmethoden wie der Leitfähigkeitsmessung erfüllt. Die Charakterisierung der Analyte erfolgt dabei über deren spezielle elektrische Leitfähigkeit. Eine bestimmte Substanz generiert in einem gegebenen Elektrolytsystem immer die gleiche relative Leitfähigkeit. Dies gilt für aufeinander folgende Messungen in einer miniaturisierten  
25 Analyseeinheit und auch für Messungen, die in mehreren miniaturisierten Analyseeinheiten eines Bautyps erfolgen.

Bevorzugt wird in der erfindungsgemäßen Vorrichtung daher eine elektrische Leitfähigkeitsmessung verwendet, die im Falle von direkt  
30 kontaktierenden Elektroden den elektrischen Strom oder den elektrischen Spannungsabfall erfaßt oder aber im Falle von galvanisch entkoppelten Elektroden über die Messung des dielektrischen Widerstandes erfolgt.

Zum Einkoppeln bzw. Auskoppeln von optischer Leistung in bzw. aus einem Kanal werden überwiegend Verfahren verwendet, bei denen optische Fasern direkt vor einer Glaskapillare (z.B. „klassische CE“) positioniert werden. Für die Laser-induzierte Fluoreszenzmessung (LIF) in 5 mikrostrukturierten Kanälen in planaren zweidimensionalen Systemen haben sich Verfahren etabliert, bei denen das anregende Laserlicht auf den Kanal über eine Freistrahloptik fokussiert wird und die Fluoreszenz über ein freistrahloptisches System (Mikroskop, evtl. konfokal, mit optischem Detektor, z.B. CCD-Kamera) detektiert wird.

10 Das Ein- und/oder Auskoppeln optischer Leistung in definierte Bereiche mikrostrukturierter planarer fluidischer Systeme wird durch die in Abbildung 5 gezeigte Anordnung in geeigneter Weise realisiert. Diese bevorzugte Anordnung erlaubt das Heranführen einer bzw. mehrerer optischer Fasern 15 an die mikrostrukturierten Kanäle. Die Anordnung besteht aus einem sogenannten Doppelkonus (7), in den optische Fasern (8) eingebracht sind. Dieser Doppelkonus verschließt in dieser Ausführungsform den Kanal, d.h. das fluidische System (6) flüssigkeits- und gasdicht und ermöglicht gleichzeitig, optische Leistung an definierte Positionen in den Kanal hinein- 20 bzw. hinauszuführen. Da für die Fluidik-Anschlußtechnik im wesentlichen die optische Faser gegen einen Schlauch mit sehr dünnem Durchmesser ersetzt wird, sind Fluidik- und Optik-Verbindung in einfacher Weise kombinierbar. Der Anschluß mittels einem Doppelkonus kann daher ebenso für fluidische Anschlüsse verwendet werden, wenn statt der optischen 25 Fasern ein Schlauch oder eine Kapillare eingebracht wird.

Im Falle eines optischen Anschlusses ist es zusätzlich möglich, durch denselben Anschluß Anregungslicht ein- und Emission auszukoppeln. Hierzu werden entweder zwei Fasern in den Konus eingesetzt, um 30 Anregung und Emission in zwei getrennten Fasern führen zu können oder es wird in einer Faser sowohl die Anregungswellenlänge als auch die

Emissionswellenlänge geführt. Dann sind ein zusätzlicher 3 dB-Koppler und ein optischer Filter zum Eliminieren der Anregungswellenlänge notwendig.

5 Soll die optische Faser keinen direkten Kontakt zur Flüssigkeit haben, um eine Verschmutzung derselben zu vermeiden, kann eine dünne Materialschicht (9) im Substrat (2) verbleiben. Der Konus hat in diesem Fall keine Dichtfunktion.

#### Adapterkammer:

10 Die Adapterkammer besitzt typischerweise eine Vorrichtung zur Arretierung der Durchflußeinheit. Weiterhin dient sie dem reversiblen Anschluß von Fluidik, Elektrik, Elektronik und Optikverbindungen. Auf diese Weise kann die Durchflußeinheit möglichst nur das Kanalsystem und notwendige

15 Aussparungen zum Anschluß von Fluidik, Elektrik etc. enthalten. Alle weiteren Funktionalitäten werden durch die Adapterkammer zur Verfügung gestellt und können, wenn sie benötigt werden, an die Durchflußeinheit angeschlossen werden. So kann die Durchflußeinheit beliebig oft ausgetauscht werden oder bezüglich des Designs der Kanalstruktur und

20 optionaler weiterer Funktionen, wie bestimmter Detektoren, Reaktionskammern etc. verändert werden, ohne daß die Adapterkammer stark verändert werden muß. Die Adapterkammer enthält also z.B. eine Auswahl folgender Funktionalitäten: reversible Verbindungen der Leistungselektroden mit der Spannungsversorgung, reversible Verbindung

25 der Detektionselektroden mit dem Meßgerät für elektrische Leitfähigkeit, Zuleitungs- und Ableitungskapillaren für Trennpuffer und Probenmaterial, Anschlüsse für invasive Detektoren (potentiometrische oder amperometrische Detektoren, Lichtleitfasern für Durchlicht-, Streulicht- oder Fluoreszenzmessung etc.), ableitende Kapillaren zum Ausschleusen von

30 abgetrennten Komponenten, Kühlvorrichtung zur Ableitung von Joule'scher Wärme während einer Elektrophorese, Einrichtung zur Kontrolle der

relativen Luftfeuchte und Staubpartikeldichte in der Umgebung der Durchflußeinheit.

5 Der Anschluß der Funktionalitäten an die Durchflußeinheit erfolgt typischerweise über eine in die Adapterkammer integrierte Halterung, meist in Form einer Platte. Auf dieser Halterung befinden sich an Positionen, die zu entsprechenden Aussparungen in der Durchflußeinheit korrespondierend sind, passende Anschlußelemente. Als  
10 Anschlußelemente werden erfindungsgemäß Anschlüsse bezeichnet, die für die Verbindung zwischen der Durchflußeinheit und den Funktionalitäten in der Adapterkammer sorgen. Die Kraft, die für die Dichtung zwischen den Anschlußelementen und den Aussparungen auf der Durchflußeinheit erforderlich ist, wird bevorzugt durch eine Anpressplatte vermittelt, die die Halterung mit den Anschlußelementen an die Durchflußeinheit anpresst.  
15 Die Versorgung der Anschlußelemente erfolgt bevorzugt durch Zuleitungen von der rückwärtigen Seite der Halterung.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform sind die Anschlußelemente nicht in einer Halterung positionsgenau fixiert, sondern können über  
20 variable Schläuche oder Teleskoparme an jede beliebige Position in der Durchflußeinheit angeschlossen werden. In diesem Fall muß die Abdichtung für jeden Anschluß individuell z.B. über Klammern etc. erfolgen. Diese Ausführungsform ermöglicht eine größere Variabilität bezüglich des Designs der Durchflußeinheit erfordert jedoch größeren Aufwand bei deren  
25 Anschluß.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt daher die Verbindung der Leitungs- und Detektionselektroden mit der Versorgungsspannung und dem Leitfähigkeitsdetektor über Teleskopelektroden, die an  
30 einer Seite der Halterung angebracht sind. Die Fluidikanschlüsse dagegen sind positionsgenau korrespondierend zur Durchflußeinheit auf der Halterung angebracht. Soll eine Durchflußeinheit mit geänderter

Kapillargeometrie verwendet werden, so muß die Halterung gegen eine Halterung mit entsprechend positionierten Fluidikanschlüssen ausgetauscht werden.

- 5      Abbildung 6 zeigt schematisch die Anbindung von Fluidik und Elektrik an eine Durchflußeinheit. Die Durchflußeinheit besteht aus einem Substrat (1) und einem Deckel (2). Das Substrat (1) ist mikrostrukturiert, so daß das Kanalsystem (3) entsteht. Auf den Deckel (2) ist eine Leistungs- oder Detektionselektrode (4) aufgebracht. Die Durchflußeinheit wird von einer
- 10      Arretiervorrichtung (5) gehalten. Oberhalb der Durchflußeinheit befindet sich die Halterung (6) mit den Anschlußelementen, einem Fluidikanschluß (8a-8c) und einer Elektrodenanbindung (9a-9c). Der Fluidikanschluß wird hier zusätzlich durch eine austauschbare Dichtungsplatte (7) mit Kontaktelementen gehalten. Der Fluidikanschluß besteht im wesentlichen
- 15      aus einem Schlauchanschluß (8a) mit einer Anpressschraube zur Befestigung und Abdichtung der zuführenden Kapillare, einem Dichtelement (8b) und einem weiteren Dichtelement (8c), das paßgenau in die Ausparung in dem Substrat (1) eingefügt werden kann und so die Verbindung des Fluidikanschlusses mit der Kanalstruktur bewirkt. Die
- 20      Elektrodenanbindung besteht im wesentlichen aus einem elektrischen Kontakt für Hochspannung oder zur Detektion (9a), einer Feder (9b) und einem Kontaktteil (9c), das mithilfe der Feder mit der Elektrode (4) in Kontakt gebracht werden kann.
- 25      Die Steuerung der erfindungsgemäßen Analyseeinheit, inklusive der Spannungsversorgung, dem Umschalten der Spannung, der Detektoren, der Fluidikanschlüsse etc. erfolgt bevorzugt mittels entsprechender Computersysteme. Es ist ebenso möglich, für bestimmte Schaltvorgänge eine manuelle Steuerung vorzusehen. Falls die Analyseeinheit eine
- 30      Vorrichtung zum Ausschleusen von Substanzen besitzt, ist typischerweise auch die für diesen Vorgang notwendige Schaltvorrichtung in das allgemeine Schaltsystem integriert.

Die erfindungsgemäße Analyseeinheit ermöglicht durch die Kombination der erfindungsgemäßen Probenaufgabe, der Möglichkeit, an jeder beliebigen Stelle der Durchflußeinheit Elektroden zu integrieren und der  
5 erfindungsgemäßen Ausschleusevorrichtung die Durchführung verschiedenster Trennungen und Analysen. Da sehr große Probenvolumina aufgegeben werden können, ist die Analyseeinheit insbesondere für die Probenvorbereitung geeignet. Beispielsweise können folgende Trenn- und  
10 Analysenprobleme behandelt werden:

10

1. Abreicherung von Matrixkomponenten aus einer Primärprobe, bevorzugt dann, wenn die Primärprobe einen wesentlichen Anteil an ionischen Matrixkomponenten enthält, die eine höhere elektrophoretische  
15 Beweglichkeit als der Analyt besitzen.

15

Beispielsweise sind dies Analyten, wie Proteine, komplexe Kohlehydrate oder Fragmente biologischer Membranen. Aus der Primärprobe werden niedermolekulare Salze elektrophoretisch extrahiert.

Anschließend wird die so hergestellte Sekundärprobe bevorzugt  
20 hydrodynamisch einem weiteren analytischen Prozeß zugeführt. Nähere Angaben zur Matrixabreicherung bei sauren oder basischen Proteinen finden sich in Beispiel 1 und 2.

2. Extraktion von Analyten aus der Primärprobe, bevorzugt wenn die  
25 Primärprobe einen wesentlichen Anteil von Matrixkomponenten enthält, die eine geringere elektrophoretische Beweglichkeit besitzen als der Analyt.

Ein Beispiel hierfür ist die Abtrennung von Alkalikationen aus Serum, Plasma oder Vollblut (siehe Beispiel 3). Bei diesem Beispiel ist  
30 sicherzustellen, daß es in der Sekundärprobe nicht zu einer Verdünnung der extrahierten Elektrolyte kommt. Die Durchflußeinheit muß wegen der

nach der Extraktion verbleibenden Matrixrückstände entweder ausgewechselt oder gereinigt werden.

5 3. Abtrennung der Analyten aus der Primärprobe, wenn sowohl wesentliche Anteile von elektrophoretisch mobileren als auch elektrophoretisch weniger mobilen Bestandteilen vorhanden sind.

Dieser in der Praxis häufige Fall erfordert die Überwachung der elektrophoretischen Trennung, wobei die Volumenelemente, die Analyten enthalten, 1. identifiziert werden müssen, 2. deren geometrische  
10 Ausdehnung bestimmt werden muß und 3. die Volumenelemente der Sekundärprobe durch einen gesteuerten Fluidikvorgang (Ausschleusen) von den Volumenelementen der Matrix abgetrennt werden müssen. In Beispiel 4 ist die Auftrennung von organischen Säuren aus Wein gezeigt.

15 4. Anreicherung von Analyten im Unterschub

Die erfindungsgemäße Analyseeinheit gestattet die Anreicherung von Analyten, die in Spuren in einer Matrix aus ähnlich elektrophoretisch mobilen Substanzen enthalten sind, falls Bedingungen gefunden werden können, unter denen sich die elektrokinetischen Mobilitäten der Analyten  
20 um einige Prozent von den elektrokinetischen Mobilitäten der Überschubkomponenten unterscheiden. Das Verfahren der Isotachophorese ermöglicht die Entmischung von gelösten ionischen Komponenten. Im Gegensatz zu chromatographischen Verfahren spielen molekulare Wechselwirkungen zwischen Komponenten der Primärprobe  
25 mit einer stationären, heterogenen Phase keine Rolle. Ebenso werden keine homogenen, stationären Phasen wie immobilisierte Puffer oder porenbildende Gele verwendet. Weiterhin kommt es im Verlauf der Abtrennung der Analyten nicht zu einer zunehmenden Verdünnung mit dem Lösungsmittel. Im Gegenteil ist es möglich, die Analyten in homogenen  
30 Zonen aufzukonzentrieren.

Neben den Abtrennen und Aufkonzentrieren des Spurenanalyten muß sichergestellt werden, daß das sehr kleine Volumenelement, welches den Spureneanalyten enthält, in einfacher Weise detektiert werden kann. Dazu verwendet man bevorzugt einen sogenannten Spacer, der der Primärprobe  
5 zugesetzt wird. Der Spacer besitzt eine ähnliche elektrophoretische Mobilität wie der Analyt und wird mit ihm zusammen detektiert und selektioniert. Der Spacer hat keinen oder geringen Einfluß auf den mit der Sekundärprobe vollzogenen analytischen Prozeß. In Beispiel 4 b) und c) wurde der Probe jeweils Aspartat als interner Standard und Spacer  
10 zwischen Gluconat und Succinat zugesetzt.

Bevorzugt wird die erfindungsgemäße Analyseeinheit derart eingesetzt, daß Serien von zeitlich aufeinander folgenden Probenzuführungen durchgeführt werden können, ohne Reagenzien oder die Durchflußeinheit  
15 zu erneuern. Nach dem Abschluß der Serie können die Reagenzien und die Durchflußeinheit in einfacher Weise ausgetauscht werden. Ein großer Vorteil der Erfindung besteht darin, daß die analytische Leistung der Probenvorbereitung über einen langen Zeitraum ohne Wartungsaufwand wiederholt verfügbar ist und Ort sowie Zeitpunkt des analytischen Einsatzes  
20 in einem weiten Rahmen wählbar sind. In einer bevorzugten Ausführungsform vereinigt die erfindungsgemäße Analyseeinheit die Vorteile eines softwareüberwachten Komplettsystems: Normierbarkeit der Probenvorbereitung, Wiederholbarkeit der Auftrennung, Qualitätskontrolle, intrinsische Fehlererkennung, mit den Vorteilen der Miniaturisierung, wie  
25 geringe Gerätekosten, Mobilität, geringe Größe, niedrige Betriebskosten und einfache Bedienung

Weiterhin ist es in einfacher Weise möglich verschiedene Detektoren in den direkten Kontakt zum aufgetrennten Probenmaterial zu bringen und das  
30 Gerät in einfacher Weise zur Probenvorbereitung und als miniaturisiertes Analysensystem einzusetzen.

5 Auch ohne weitere Ausführungen wird davon ausgegangen, daß ein Fachmann die obige Beschreibung im weitesten Umfang nutzen kann. Die bevorzugten Ausführungsformen und Beispiele sind deswegen lediglich als beschreibende, keineswegs als in irgendeiner Weise limitierende Offenbarung aufzufassen.

10 Die vollständige Offenbarung aller vor- und nachstehend aufgeführten Anmeldungen, Patente und Veröffentlichungen, insbesondere der korrespondierenden Anmeldungen DE 199 27 533.5, DE 199 27 534.3 und DE 199 27 535.1, eingereicht am 16.06.1999, und PCT/EP 00/05204, PCT/EP 00/05205 und PCT/EP 00/05206, eingereicht am 06.06.2000, ist durch Bezugnahme in diese Anmeldung eingeführt.

## 15 **Beispiele**

### **1.Beispiel Matrixabreicherung bei sauren Proteinen**

20 Die Primärprobe enthält saure Proteine mit isoionischen Punkten im Bereich von  $pI=5$  bis  $pI=6$ . Von dieser Proteinfraction sollen weitere Matrixbestandteile besonders aber basische Proteine mit isoionischen Punkten im Bereich  $pI = 9$  bis  $pI = 10$  abgetrennt werden.

Trennbedingungen:

25 Die Leistungselektrode des Endpuffers ist als Kathode geschaltet. Der pH-Wert des Leitpuffers ist im Bereich  $pH = 5,5$ . Unter diesen Bedingungen weisen die sauren Proteine eine vernachlässigbare Nettoladung auf und wandern nicht im elektrischen Feld, sondern verbleiben während der Isotachophorese im Probeneingabesegment. Die basischen Proteine weisen dagegen eine positive Überschußladung auf und wandern in  
30 Richtung der Kathode. Je nach Aufgabenstellung können entweder nur die Matrix-abgereicherten, sauren Proteine als Sekundärprobe aus dem Probeneingabesegment entnommen werden, oder es können zusätzlich die

basischen Proteine aus einem Trennkanalsegment entnommen werden.  
Die Gewinnung der basischen Proteine erfordert längere Trennzeit.

Elektrolytsystem:

Leitpuffer: 20 mM Natriumacetat + Essigsäure + MHEC

5 (Methylhydroxyethylzellulose zur Unterdrückung des elektroosmotischen  
Flusses) pH-Wert 5.5

Endpuffer : 10 mM Essigsäure

## 2. Beispiel Matrixabreicherung bei basischen Proteinen

10

Die Zusammensetzung der Probe ist entsprechend Beispiel 1.

Die Leistungselektrode des Endpuffers ist als Anode geschaltet. Der pH-

Wert des Leitpuffers liegt im Bereich von pH = 9 bis pH = 10, so daß

Proteine mit isoionischen Punkten von 9 bis 10 nicht im elektrophoretischen

15 Feld wandern.

Puffersystem:

Leitpuffer : 20 mM HCl oder Essigsäure, MHEC, pH = 9.5

Endpuffer: 20 mM bis-tris Propan, pH = 10,5.

20 Weitere Puffersysteme, die für elektrophoretische Matrixabtrennung von  
Proteinen gemäß ihren isoionischen Punkten geeignet sind, sind im  
folgenden aufgeführt:

Die Leistungselektrode des Leitpuffers ist jeweils als Anode geschaltet:

25 pH 6-7

Leitpuffer: 20mM HCL + Hisdin + MHEC,

Endpuffer: 10 mM Morpholinoethansulfonsäure, MES,+ Histidin.

pH 7-8

30 Leitpuffer: 20 mM HCl + Imidazol + MHEC

Endpuffer: 10 mM  $\gamma$ -Morpholinopropansulfonsäure + Imidazol

pH 8-9

Leitpuffer: 20 mM HCl + Trishydroxymethylaminomethan TRIS +MHEC

Endpuffer: 10 mM N-Tris(hydroxymethyl)methyl-3-aminopropansulfonsäure, TAPS, +TRIS

5

### 3. Beispiel Abtrennung von Kationen aus Serum

Die Primärprobe, Serum, wird 10-fach mit Wasser verdünnt und über eine 0,45 µm Membran filtriert.

10

Leitpuffer: 15 mM Cäsiumacetat + Weinsäure + 75 mM 18-Krone-6-Ether + 10% Polyethylenglycol (300) + 0,1% Polyethylenglycol (5000000), pH = 5,0

Endpuffer: 10 mM Zinkacetat + Essigsäure, pH = 5,8.

Strom: 1,2: 15 mA

15

Das Ergebnis der Analyse findet sich in Abbildung 7 (Auf der Abszisse ist die Zeit in Sekunden aufgetragen).

1 = Ammonium

2 = Natrium

3 = Magnesium

20

4 = Calcium

5 = Kalium

R = Widerstand

LE = Leitpuffer

TE = Endpuffer

25

### 4. Beispiel Analyse von Wein

#### Trennbedingungen:

30

LE: 10 mmol/l HCl +  $\beta$ -Alanin + 0.1 % Methylhydroxyethylcellulose,  
pH = 2.9

TE 1: 5 mmol/l Capronsäure + Histidin, pH = 6.0

TE 2: 5 mmol/l Glutaminsäure + Histidin, pH = 5.0

5 In den Abbildungen 8 bis 10 ist die Auftrennung der folgenden Proben dargestellt. Auf der Abszisse ist die Zeit in Sekunden, auf der Ordinate der Widerstand R angegeben. Das in Beispiel 4 b) und c) zugegebene Aspartat fungiert als interner Standard und als Spacer zwischen Gluconate (9) und Succinat (11).

a)

10 Abb. 8:

0.2 mmol/l Sulphat, Sulphit, Phosphat, Malonat, Tartrat, Citrat, Malat, Lactat, Gluconat, Aspartat, Succinat, Acetat, Ascorbat, Sorbat

Strom 1: 10  $\mu$ A

15 Strom 2: 10  $\mu$ A

b)

Abb. 9:

20-fach verdünnter Weißwein + 0.25 mmol/l Aspartat

20 Strom 1: 20  $\mu$ A

Strom 2: 10  $\mu$ A

c)

Abb.10:

20-fach verdünnter Rotwein + 0.25 mmol/l Aspartat

25

Strom 1: 20  $\mu$ A

Strom 2: 10  $\mu$ A

Die Nummerierung der Abbildungen 8 bis 10 gibt folgende Bestandteile an:

30

1 = Sulphat

2 = Sulphit

- 3 = Phosphat  
4 = Malonat  
5 = Tartrat  
6 = Citrat  
5. 7 = Malat  
8 = Lactat  
9 = Gluconat  
10 = Aspartat als interner Standard  
11 = Succinat  
10 12 = Ascorbat  
13 = Acetat  
14 = Sorbat  
i = Verunreinigungen

15

20

25

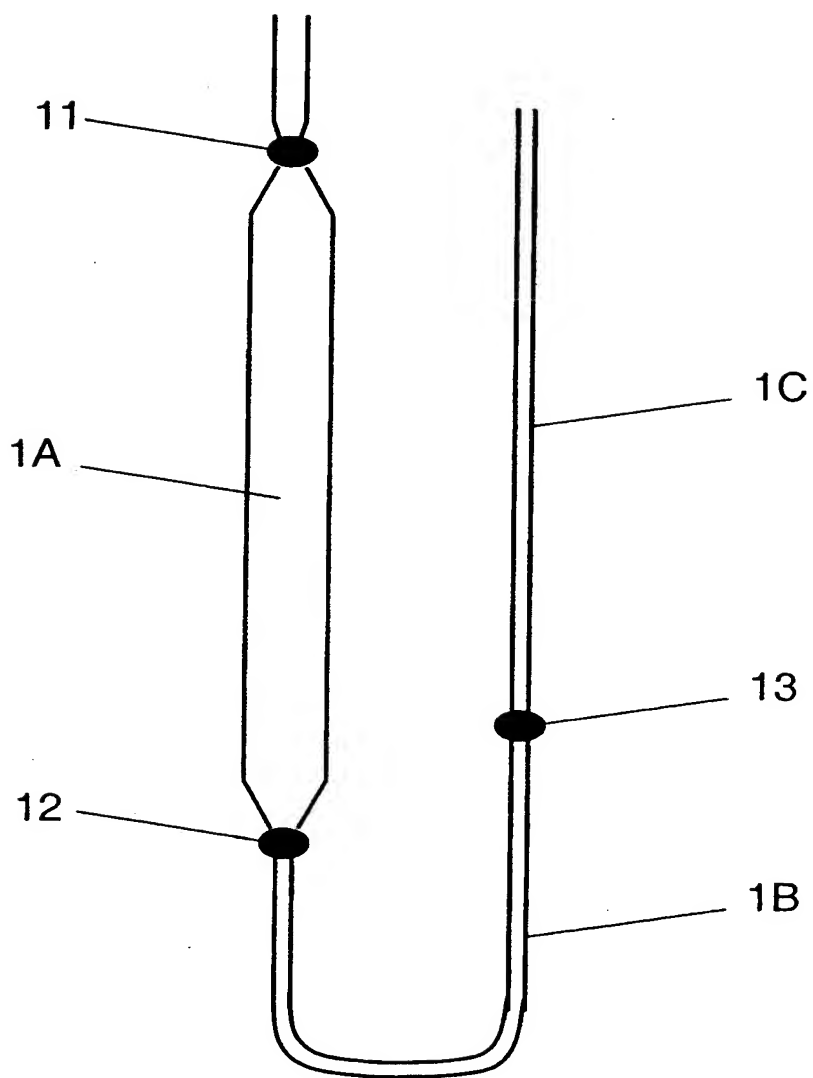
30

## Ansprüche

1. Analyseeinheit zur Probenvorbereitung, zumindest umfassend eine Durchflußeinheit aus Kunststoff mit einem mikrostrukturierten Kanalsystem, eine Adapterkammer zur reversiblen Aufnahme der Durchflußeinheit, eine Fluidikversorgung, eine Spannungsversorgung und mindestens einen Detektor, dadurch gekennzeichnet, daß zur Aufnahme der Probe ein Kanalabschnitt vorgesehen ist, an dessen Enden sich jeweils Fluidikanschlüsse befinden.
2. Analyseeinheit nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine Vorrichtung zum Ausschleusen von Probenteilen, die im wesentlichen aus einem Kanalsystem mit mindestens einer Y-Verzweigung, mindestens drei Transportelektroden und mindestens einer Detektionsvorrichtung vor besagter Verzweigungsstelle des Kanalsystems und einer elektrischen Schaltvorrichtung besteht, in die Analyseeinheit integriert ist.
3. Analyseeinheit nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Fluidikanschlüsse Peristaltikpumpen, Spritzen oder Spritzenpumpen sind.
4. Verwendung der Analyseeinheit nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur isotachophoretischen Auftrennung einer Probe.
5. Verwendung der Analyseeinheit entsprechend einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Abreicherung von Matrixkomponenten aus einer Primärprobe, zur Extraktion von Analyten aus einer Primärprobe, zur Abtrennung von Analyten aus der Primärprobe oder zur Anreicherung von Analyten im Unterschuß.

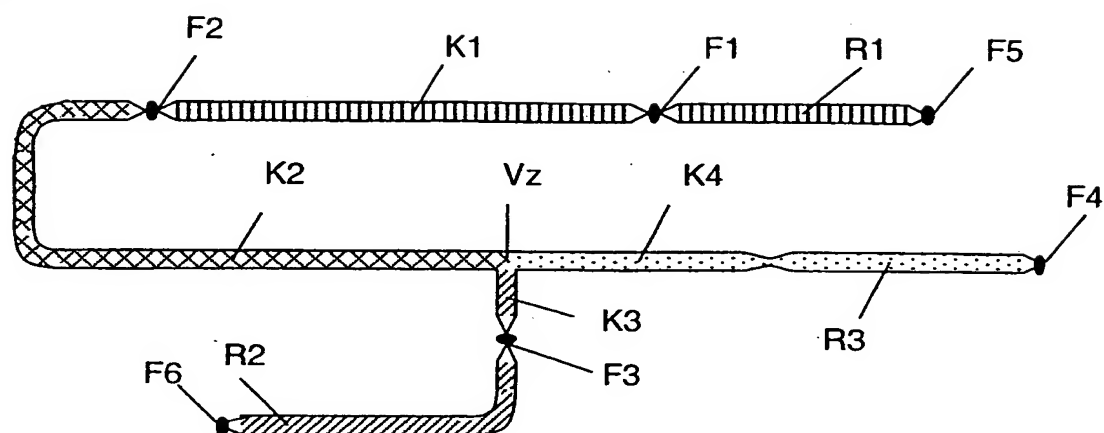
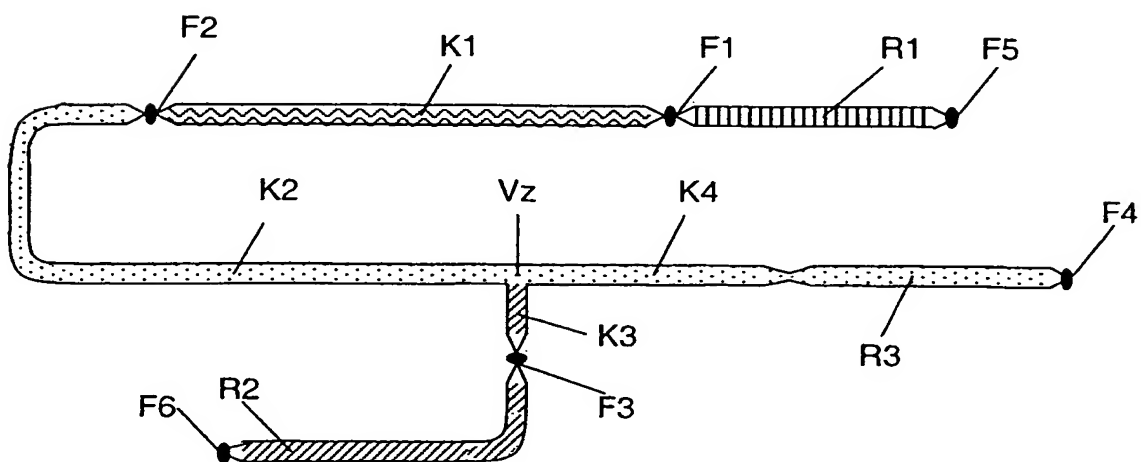
1/10

Fig. 1



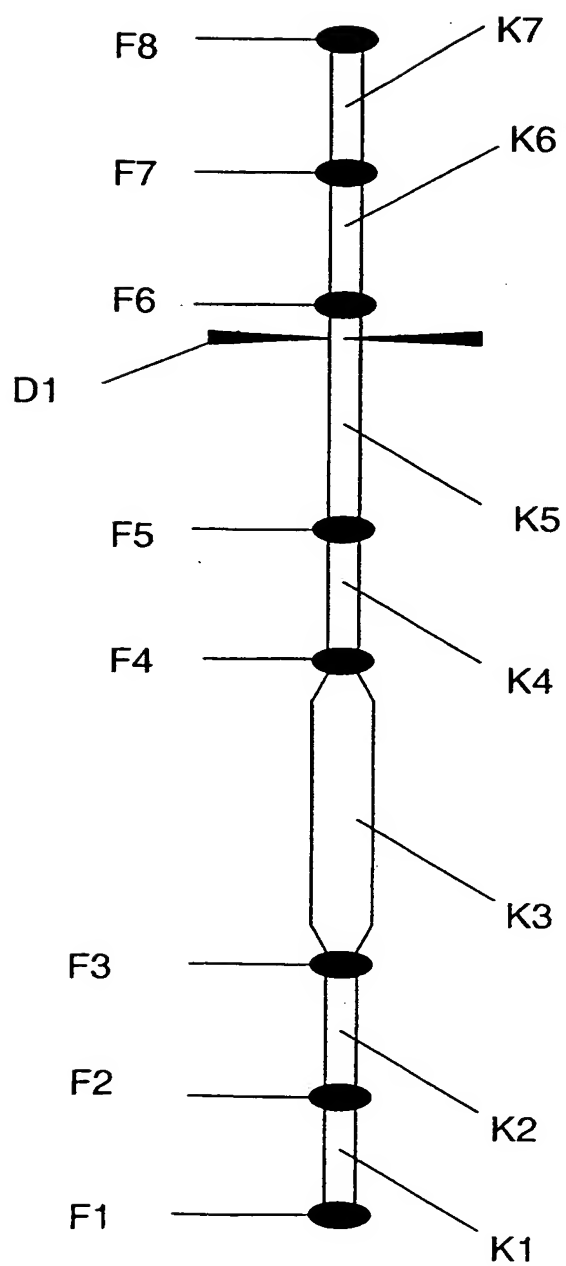
2/10

Fig. 2

**A****B**

3/10

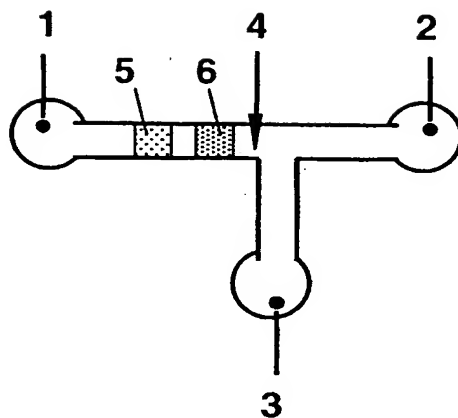
Fig. 3



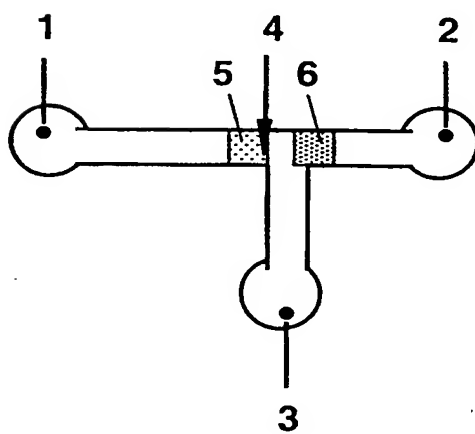
4/10

Fig. 4

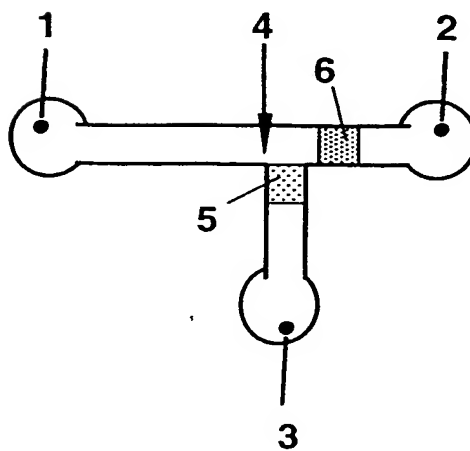
A



B

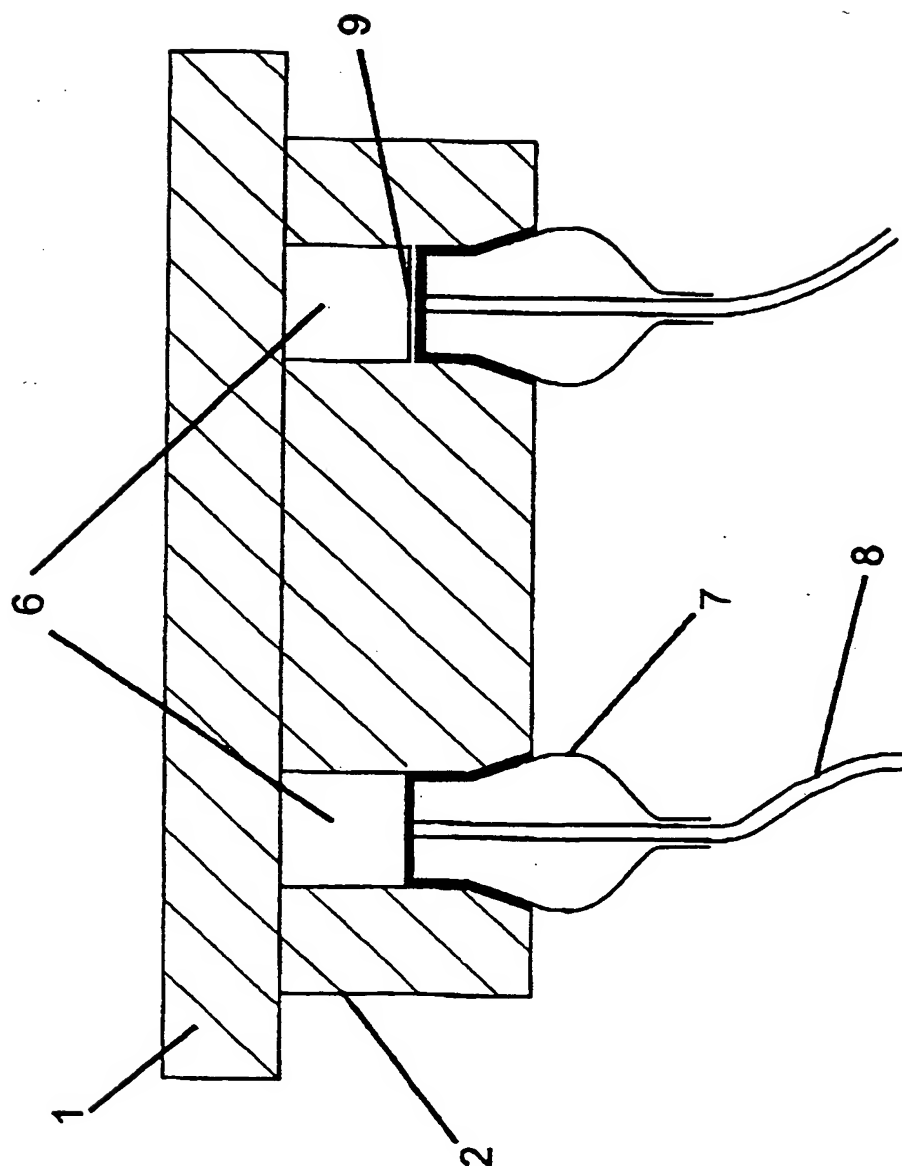


C



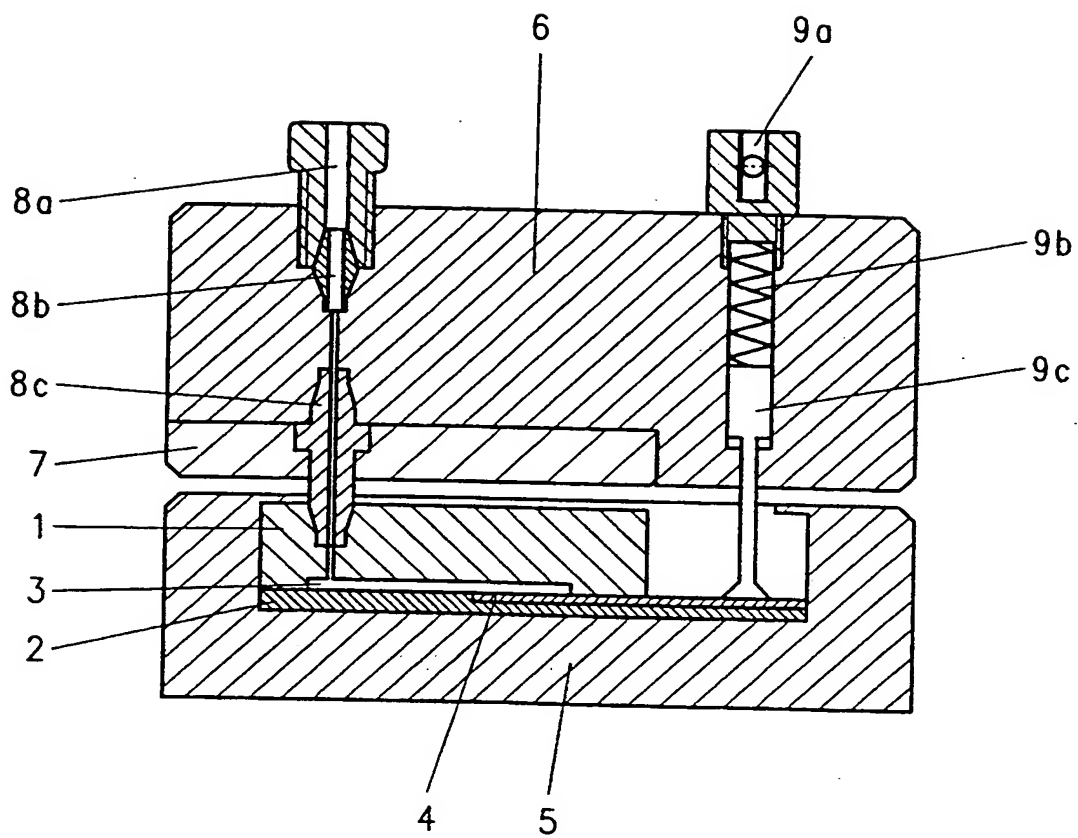
5/10

Fig. 5



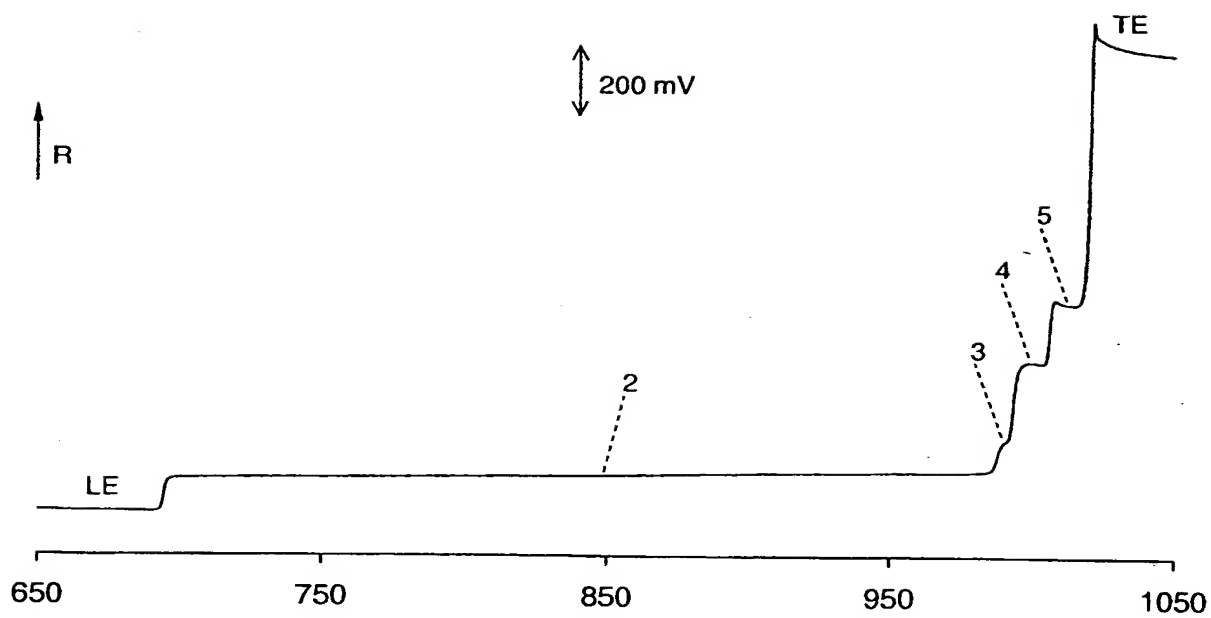
6/10

Fig. 6



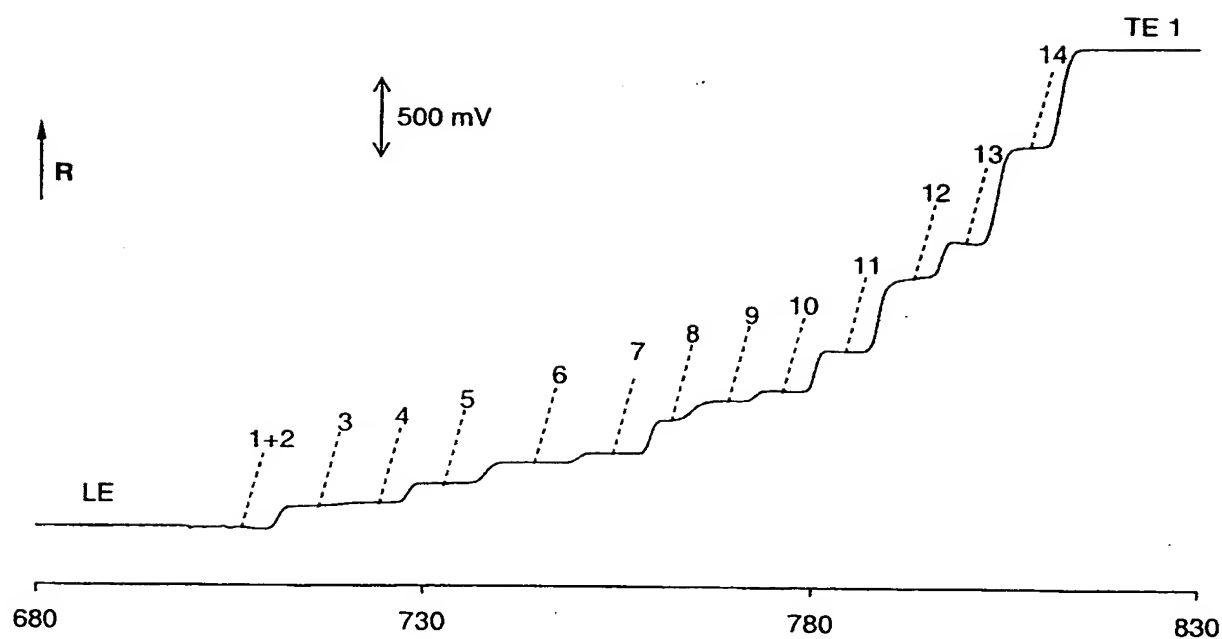
7/10

Fig. 7



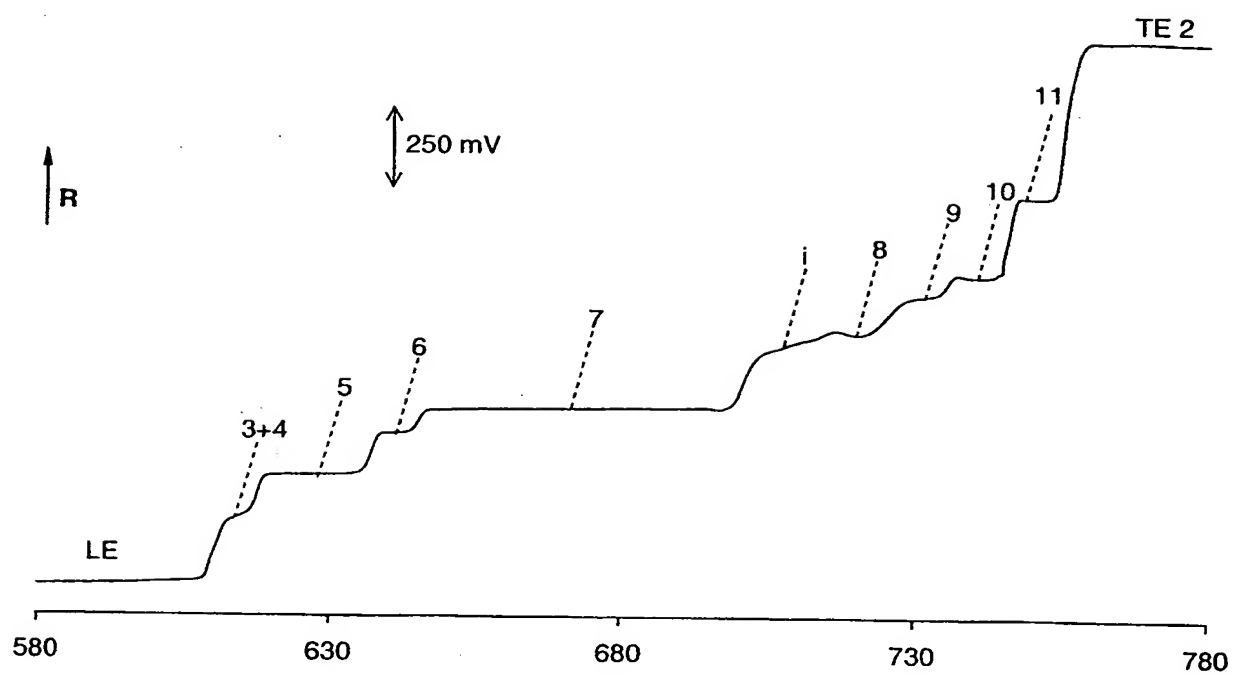
8/10

Fig. 8



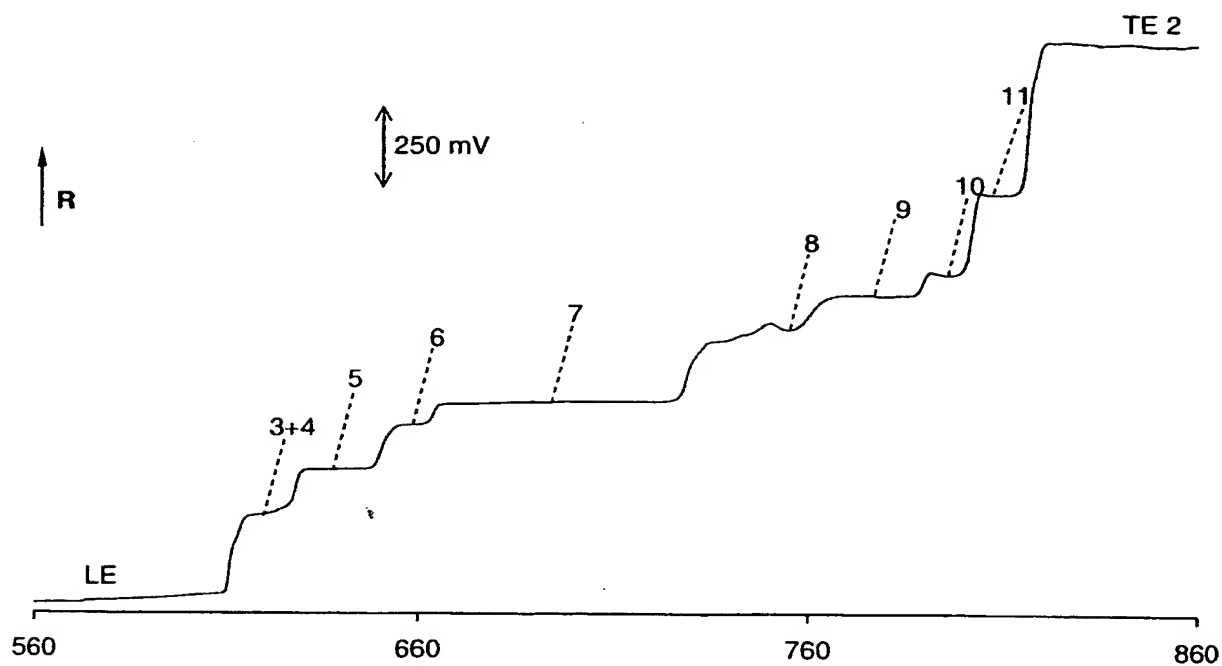
9/10

Fig. 9



10/10

Fig. 10



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter Application No

PCT/EP 00/05518

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 IPC 7 G01N27/447 B01L3/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N B01L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EP0-Internal

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 98 05424 A (CHOW CALVIN Y H ;CALIPER TECHN CORP (US)) 12 February 1998 (1998-02-12) the whole document	1-5
Y	WO 96 04547 A (LOCKHEED MARTIN ENERGY SYS INC ;RAMSEY J MICHAEL (US)) 15 February 1996 (1996-02-15) page 10, line 7-31 page 24, line 18; figure 1	1-5
Y	WO 98 52691 A (ALBERTA RES COUNCIL ;UNIV ALBERTA (CA)) 26 November 1998 (1998-11-26) page 11, line 4-20	3-5
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 September 2000

Date of mailing of the international search report

17/10/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Brison, O

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter Application No  
PCT/EP 00/05518

## C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>BLANKENSTEIN G ET AL: "MODULAR CONCEPT OF A LABORATORY ON A CHIP FOR CHEMICAL AND BIOCHEMICAL ANALYSIS"            BIOSENSORS &amp; BIOELECTRONICS, GB, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, BARKING,            vol. 13, no. 3/04, 1998, pages 427-438,            XP000700154            ISSN: 0956-5663            figure 3</p>	1-3
A	<p>US 5 519 635 A (MIYAKE RYO ET AL)            21 May 1996 (1996-05-21)            the whole document</p>	1-3
A	<p>WO 99 10735 A (BOUSSE LUC J ; CHOW CALVIN Y H (US); KENNEDY COLIN B (US); PARCE J)            4 March 1999 (1999-03-04)            page 1, line 15 - page 21, line 24; figure 2A</p>	1-3
A	<p>US 5 876 675 A (KENNEDY COLIN B)            2 March 1999 (1999-03-02)            column 9, line 45 - column 10, line 24</p>	1-3

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter Application No

PCT/EP 00/05518

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9805424	A	12-02-1998	AU 717981 B	06-04-2000
			AU 3815697 A	25-02-1998
			CA 2259929 A	12-02-1998
			CN 1226845 A	25-08-1999
			EP 0952890 A	03-11-1999
			US 6071478 A	06-06-2000
			US 5955028 A	21-09-1999
WO 9604547	A	15-02-1996	US 6001229 A	14-12-1999
			AU 701348 B	28-01-1999
			AU 3150895 A	04-03-1996
			CA 2196429 A	15-02-1996
			CN 1168720 A, B	24-12-1997
			EP 0775306 A	28-05-1997
			JP 10507516 T	21-07-1998
			US 6010607 A	04-01-2000
			US 6010608 A	04-01-2000
			US 6033546 A	07-03-2000
			US 5858195 A	12-01-1999
WO 9852691	A	26-11-1998	AU 7421898 A	11-12-1998
			EP 0981408 A	01-03-2000
US 5519635	A	21-05-1996	JP 2948069 B	13-09-1999
			JP 7083935 A	31-03-1995
WO 9910735	A	04-03-1999	US 5989402 A	23-11-1999
			AU 9205298 A	16-03-1999
			EP 1007954 A	14-06-2000
US 5876675	A	02-03-1999	US 6048498 A	11-04-2000



## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>BLANKENSTEIN G ET AL: "MODULAR CONCEPT OF A LABORATORY ON A CHIP FOR CHEMICAL AND BIOCHEMICAL ANALYSIS"</p> <p>BIOSENSORS &amp; BIOELECTRONICS,GB,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, BARKING, Bd. 13, Nr. 3/04, 1998, Seiten 427-438, XP000700154</p> <p>ISSN: 0956-5663</p> <p>Abbildung 3</p>	1-3
A	<p>US 5 519 635 A (MIYAKE RYO ET AL)</p> <p>21. Mai 1996 (1996-05-21)</p> <p>das ganze Dokument</p>	1-3
A	<p>WO 99 10735 A (BOUSSE LUC J ;CHOW CALVIN Y H (US); KENNEDY COLIN B (US); PARCE J)</p> <p>4. März 1999 (1999-03-04)</p> <p>Seite 1, Zeile 15 -Seite 21, Zeile 24;</p> <p>Abbildung 2A</p>	1-3
A	<p>US 5 876 675 A (KENNEDY COLIN B)</p> <p>2. März 1999 (1999-03-02)</p> <p>Spalte 9, Zeile 45 -Spalte 10, Zeile 24</p>	1-3

# INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die der selben Patentfamilie gehören

Intern Aktenzeichen

PCT/EP 00/05518

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9805424 A	12-02-1998	AU 717981 B	06-04-2000
		AU 3815697 A	25-02-1998
		CA 2259929 A	12-02-1998
		CN 1226845 A	25-08-1999
		EP 0952890 A	03-11-1999
		US 6071478 A	06-06-2000
		US 5955028 A	21-09-1999
WO 9604547 A	15-02-1996	US 6001229 A	14-12-1999
		AU 701348 B	28-01-1999
		AU 3150895 A	04-03-1996
		CA 2196429 A	15-02-1996
		CN 1168720 A, B	24-12-1997
		EP 0775306 A	28-05-1997
		JP 10507516 T	21-07-1998
		US 6010607 A	04-01-2000
		US 6010608 A	04-01-2000
		US 6033546 A	07-03-2000
		US 5858195 A	12-01-1999
WO 9852691 A	26-11-1998	AU 7421898 A	11-12-1998
		EP 0981408 A	01-03-2000
US 5519635 A	21-05-1996	JP 2948069 B	13-09-1999
		JP 7083935 A	31-03-1995
WO 9910735 A	04-03-1999	US 5989402 A	23-11-1999
		AU 9205298 A	16-03-1999
		EP 1007954 A	14-06-2000
US 5876675 A	02-03-1999	US 6048498 A	11-04-2000